

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ — ОСНОВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ И ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

**Под редакцией
В. С. Баранова**



ИЗДАТЕЛЬСТВО Н-Л

Санкт-Петербург, 2009

УДК 575
ББК 52.5
Г34

*Под редакцией член-корреспондента РАМН,
заслуженного деятеля науки РФ, д. м. н., профессора В. С. Баранова*

Г34 Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. — 528 с.: ил.

ISBN 978-5-94869-084-1

В доступной форме в книге изложены основные события, произошедшие в медицинской генетике и в молекулярной медицине после расшифровки генома человека. Даны современные представления о структуре генома, генетическом полиморфизме, генах-кандидатах, ассоциированных с такими частыми заболеваниями, как бронхиальная астма, остеопороз, нейродегенеративные болезни, диабет, с различной тяжелой акушерской патологией. Книга рассчитана на практикующих врачей, студентов мединститутов и биофаков университетов и, конечно, на специалистов по медицинской генетике. Широкому кругу читателей книга даст представление о генетическом тестировании, вариантах генетического паспорта, состоянии и перспективах новых направлений предиктивной медицины: нутригеномике, спортивной генетике, генетике старения и фармакогенетике.

Рецензенты:

Н. П. Бочков, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, д. м. н., профессор, вице-президент РАМН, член совета Российского фонда фундаментальных исследований.

Е. К. Гинтер, академик РАМН, д. б. н., профессор, директор ГУ МГНЦ РАМН.

В. П. Пузырев, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой медицинской генетики лечебного факультета СибГМУ.

УДК 575
ББК 52.5

ISBN 978-5-94869-084-1

© ООО «Издательство Н-Л», 2009

© Коллектив авторов, 2009

*Дорогим сотрудникам —
моим последователям
и
любимым детям —
Елене и Владиславу
посвящается
В. С. Баранов*

**Раньше считали, что судьба человека
написана на звездах. Теперь мы знаем,
что она записана в его генах.**

Джеймс Дьюи Уотсон, 1977

**На смену малоэффективного, дорогого
и часто бесполезного лечения уже
сформировавшегося хронического
мультифакторного заболевания
должна прийти персонифицированная,
упреждающая медицина здорового
человека.**

Френсис Коллинз, 1999

**Грядет эра персонифицированной
медицины и готовиться к ней нужно
уже сегодня.**

Джордж Черч, 2007

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	11
Предисловие рецензентов	13
Предисловие автора.....	18
Введение.....	20

Глава 1. Геном человека и генетический полиморфизм.

<i>В. С. Баранов</i>	26
Введение.....	26
1.1. Основные итоги программы «Геном человека»	28
1.2. Геном человека и другие направления геномики	32
1.2.1. Сравнительная геномика	33
1.2.2. Функциональная геномика.....	34
1.2.3. Генетический полиморфизм.....	37
1.2.3.1. Международный проект «Гаплоидный геном» (НарМар).....	40
1.2.3.2. Новые проекты по изучению генома человека	43
1.2.4. Этические, правовые и социальные аспекты исследования генома человека.....	44
1.2.5. Геном человека и молекулярная медицина	45
Заключение.....	46

Глава 2. Гены, мутации, болезни. *В. С. Баранов*.....

Введение.....	48
2.1. Что есть ген? Сколько генов?.....	49
2.2. Какие есть гены?.....	51
2.3. Мутации и генетический полиморфизм.....	52
2.4. Классификация мутаций	54

2.5. Генетический груз.....	57
2.6. Гены и болезни.....	58
Заключение.....	61

Глава 3. Генные сети и гены предрасположенности. В. С. Баранов .. 63

Введение.....	63
3.1. Генные сети.....	64
3.2. Генные сети и болезни.....	67
3.3. Гены предрасположенности.....	68
3.4. Стратегия поиска генов предрасположенности.....	70
Заключение.....	74

Глава 4. Методы анализа генетического полиморфизма.

А. С. Глотов, Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов. 76

Введение.....	76
4.1. Базовые методы идентификации мутаций.....	77
4.2. Первичная идентификация мутаций.....	82
4.3. Идентификация известных мутаций.....	83
4.3.1. Метод ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза.....	84
4.3.2. Амплификация рефрактерной мутационной системы...85	
4.3.3. Лигирование синтетических олигонуклеотидных зондов....86	
4.3.4. Метод аллель-специфических олигонуклеотидов.....87	
4.3.5. ПЦР в реальном времени.....87	
4.4. Новые методы детекции мутаций и генетического полиморфизма89	
4.4.1. Метод DHPLC.....89	
4.4.2. SPR-метод.....90	
4.4.3. Методы ДНК-чипов.....92	
4.5. Метод масс-спектрометрии.....102	
4.6. Система, основанная на проточной цитометрии, или X-MAP-технология.....102	
4.7. Секвенирование ДНК с помощью нанопор.....103	
Заключение.....104	

Глава 5. Список генов-кандидатов, для которых показана ассоциация с мультифакторными заболеваниями (МФЗ) и нарушениями жизненно важных функций организма.

О. С. Глотов, А. С. Глотов, В. С. Баранов.....105

Введение.....	105
Заключение.....	133

Глава 6. Болезни и гены предрасположенности	134
6.1. Бронхиальная астма. <i>Т. Э. Иващенко, Н. А. Келембет, Ю. В. Останкова, В. С. Баранов.....</i>	134
Введение.....	134
6.1.1. Современные представления о патогенезе бронхиальной астмы.....	135
6.1.2. Генная сеть бронхиальной астмы	136
6.1.3. Гены цитокиновой системы	140
6.1.4. Гены системы синтеза оксида азота	146
6.1.5. Гены метаболизма.....	148
6.1.6. Другие гены-кандидаты бронхиальной астмы.....	153
6.1.7. Анализ генетического риска и первичная профилактика бронхиальной астмы у новорожденных детей, родившихся от беременных женщин с бронхиальной астмой.....	155
Заключение.....	160
6.2. Остеопороз. <i>М. В. Асеев, М. В. Москаленко, В. С. Баранов.....</i>	161
Введение.....	161
6.2.1. Внешние факторы — «триггеры».....	163
6.2.1.1. Гормоны.....	163
6.2.1.2. Соматическая патология.....	165
6.2.1.3. Неблагоприятные факторы образа жизни	165
6.2.2. Генетические факторы.....	166
6.2.2.1. Генные сети	166
6.2.2.2. Рецептор кальцитонина (<i>CALCR</i>).....	168
6.2.2.3. Коллаген 1-го типа (<i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>).....	170
6.2.2.4. Рецептор витамина D (<i>VDR</i>).....	175
6.2.2.5. Эстрогеновый рецептор (<i>ER</i>).....	182
6.2.2.6. Остеокальцин	185
6.2.2.7. Другие возможные гены-кандидаты	187
6.2.2.8. Генетические аспекты профилактики.....	188
Заключение.....	191
6.3. Диабет. <i>О. С. Глотов, В. С. Баранов.....</i>	192
Введение.....	192
6.3.1. Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД, СД1)	194
6.3.1.1. Генетические детерминанты СД1	196
6.3.2. Экзогенные факторы риска СД1	207
6.3.3. Генетические детерминанты СД2	209
6.3.4. Нутригеномика и диабет	212
Заключение.....	218

6.4. Нейродегенеративные заболевания. В. С. Баранов	218
Введение.....	218
6.4.1. Хорея Гентингтона (ХГ)	219
6.4.2. Болезнь Паркинсона	222
6.4.3. Болезнь Альцгеймера	226
6.4.4. Рассеянный склероз (РС).....	228
Заключение.....	230
6.5. Сердечно-сосудистые заболевания. Артериальная гипертензия. А. С. Глотов, Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов	232
Введение.....	232
6.5.1. Гены предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям	232
6.5.2. Артериальная гипертензия	233
6.5.2.1. Формирование представлений о генетической природе артериальной гипертензии	238
6.5.2.2. Ренин-ангиотензиновая и кинин-брадикининовая системы	239
6.5.2.3. Гены предрасположенности к артериальной гипертензии	241
6.5.2.3.1. Ренин.....	241
6.5.2.3.2. Ангиотензиноген	241
6.5.2.3.3. Ангиотензинпревращающий фермент	242
6.5.2.3.4. Рецептор 1 ангиотензина II	243
6.5.2.3.5. Рецептор 2 ангиотензина II	243
6.5.2.3.6. Рецептор 2 к брадикинину	244
6.5.2.4. Комплексный анализ ассоциации полиморфизма с предрасположенностью к артериальной гипертензии.....	244
Заключение.....	248
6.6. Геномика акушерской патологии	248
6.6.1. Эндометриоз. Н. Ю. Швед, М. И. Ярмолинская, М. А. Козловская, Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов	248
Введение.....	248
6.6.1.1. Патогенез	249
6.6.1.2. Генная сеть	252
6.6.1.2.1. Гены эндокринных функций	254
6.6.1.2.2. Гены иммунной системы	258
6.6.1.2.3. Гены метаболизма (системы детоксикации ксенобиотиков)	260

6.6.1.2.4. Другие возможные гены-кандидаты эндометриоза.....	271
6.6.1.2.5. Генетические аспекты лечения эндометриоза ..	273
Заключение.....	277
6.6.2. Невынашивание беременности. О. Н. Беспалова, <i>Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов</i>	280
Введение	280
6.6.2.1. Гены второй фазы детоксикации.....	282
6.6.2.2. Гены метаболизма фолиевой кислоты и витамина В ₁₂	285
6.6.2.3. Гены факторов свертывания крови	289
6.6.2.4. Гены функции эндотелия.....	292
6.6.2.5. Гены иммунной системы	295
6.6.2.6. Гены рецепторов половых гормонов	297
6.6.2.7. Гены факторов роста хориона и плаценты	298
Заключение.....	300
6.6.3. Гестоз. Г. С. Демин, О. В. Малышева, <i>Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов</i>	302
Введение	302
6.6.3.1. Современные представления о патогенезе.....	303
6.6.3.2. Генная сеть	307
6.6.3.2.1. Гены главного комплекса гистосовместимости ..	307
6.6.3.2.2. Гены цитокинов и ростовых факторов	309
6.6.3.2.3. Гены метаболизма	301
6.6.3.2.4. Гены системы свертывания крови	312
6.6.3.2.5. Гены сосудистой системы.....	316
6.6.3.2.6. Гены эндотелия сосудов	318
Заключение.....	321
6.6.4. Наследственная тромбофилия. А. С. Глотов, <i>Е. С. Вашукова, В. С. Баранов</i>	327
Введение	327
6.6.4.1. Тромбофилия.....	327
6.6.4.2. Формирование представлений о тромбофилии	328
6.6.4.3. Система гемостаза	330
6.6.4.3.1. Свертывающая система	330
6.6.4.3.2. Естественная антикоагулянтная система	333
6.6.4.3.3. Фибринолиз	333
6.6.4.4. Гены наследственной тромбофилии	334

6.6.4.5. Особенности клинического проявления наследственных форм тромбофилии	338
Заключение.....	341

Глава 7. Новые направления предиктивной медицины.

<i>В. С. Баранов</i>	346
7.1. Нутригеномика	347
Введение.....	347
7.1.1. Нутригеномика и болезни. <i>Е. В. Баранова, В. С. Баранов</i> ..	351
7.1.2. Нутригеномика, болезни и полиморфизм генов.....	353
7.1.3. Нутриенты, болезни и гены	355
7.1.4. Ген-диетные взаимодействия	357
7.1.5. Нутригеномика сегодня	361
Заклучение.....	362
7.2. Фармакогенетика. А. С. Готов, В. С. Баранов	363
Введение.....	363
7.2.1. Побочные нежелательные лекарственные реакции.....	366
7.2.2. Система биотрансформации	367
7.2.3. Гены и ферменты I фазы биотрансформации	368
7.2.4. Гены и ферменты II фазы биотрансформации	374
7.2.5. Транспортёры лекарственных средств	380
7.2.6. Фармакодинамика и полиморфизм генов.....	381
7.2.7. Биочиповые нанотехнологии в фармакогенетике.....	381
Заклучение.....	383
7.3. Генетические аспекты старения и активного долголетия. <i>О. С. Готов, Е. В. Баранова, В. С. Баранов</i>	384
Введение.....	384
7.3.1. Гены старения	386
7.3.1.1. Гены биологических часов	386
7.3.1.2. Гены «слабого звена».....	390
7.3.2. Старение — прогрессивная дегенерация транскриптома ..	393
7.3.3. Старение и пути борьбы за активное долголетие.....	396
Заклучение.....	400
7.4. Спортивная генетика. О. С. Готов, А. С. Готов, <i>В. С. Баранов</i>	401
Введение.....	401
7.4.1. Общие представления о генетических маркерах, ассоциированных с физическими качествами человека	402
7.4.2. Гены-кандидаты мышечной силы	406
7.4.3. Гены сердечно-сосудистой системы	412

7.4.4. Гены метаболизма костной ткани	417
7.4.5. Другие гены.....	418
7.4.6. Комплексный анализ аллелей выносливости и скорости/силы у спортсменов.....	420
Практические рекомендации	423
Заключение	425
Глава 8. Генетический паспорт. В. С. Баранов	427
Введение	427
8.1. Каждый человек генетически уникален.....	428
8.2. Болезни и патологические состояния, доступные для генетического тестирования.....	429
8.3. Генетическая карта (генетический паспорт).....	437
8.4. Генетический паспорт близкого будущего	444
Заключение.....	446
Глава 9. Проблемы генетического тестирования наследственной предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям.	
<i>В. С. Баранов</i>	448
Введение	448
9.1. Достоверность ассоциации генотип–фенотип при МФЗ	449
9.2. Оценка результатов предиктивного генетического тестирования	453
9.3. Рекомендации по результатам генетического тестирования	457
Заключение.....	459
Глава 10. Этические принципы предиктивной медицины.	
<i>Е. В. Баранова, В. С. Баранов</i>	461
Введение	461
10.1. Добровольность, информированность и конфиденциальность — главные этические принципы генетического тестирования	462
10.2. Сложные, спорные и еще не решенные этические и правовые вопросы генетического тестирования	466
Заключение.....	468
Заключение	470
1. Главные события.....	471
2. Научное и общественное признание	473
3. На пути к клинической медицине	475
4. Генетический паспорт и будущее предиктивной медицины ..	477
Литература.....	480

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	— артериальная гипертензия
АД	— артериальное давление
АФК	— активные формы кислорода
БА	— бронхиальная астма
БАл	— болезнь Альцгеймера
БП	— болезнь Паркинсона
БВ	— «быстрые» мышечные волокна
Г	— гестоз
ГБ	— гипертоническая болезнь
ГМК	— гладкомышечные клетки
ГП	— генетический полиморфизм
ГМЛЖ	— гипертрофия миокарда левого желудочка
ГТ	— генетические тесты
ДН	— диабетическая нефропатия
ДНП	— диабетическая нейропатия
ЗГТ	— заместительная гормонотерапия
ЗВУР	— задержка внутриутробного развития
ЖК	— жирные кислоты
ИБС	— ишемическая болезнь сердца
ИИ	— ишемический инсульт
ИМ	— инфаркт миокарда
ИЗСД	— инсулинзависимый сахарный диабет
ИНСД	— инсулиннезависимый сахарный диабет
КТ	— кальцитонин
КБС	— коронарная болезнь сердца
ЛС	— лекарственные средства
ЛПВП	— липопротеины высокой плотности
ЛПНП	— липопротеины низкой плотности
МВ	— «медленные» мышечные волокна
МПКТ	— минеральная плотность костной ткани
МФЗ	— мультифакториальные заболевания
НБ	— наследственные болезни

НГЭ	—	наружный генитальный эндометриоз
НЛР	—	нежелательные лекарственные реакции
НДЗ	—	нейродегенеративные заболевания
ОМЛ	—	острый миелолейкоз
ОНЗ (SNP)	—	однонуклеотидные замены (single nucleotide polymorphisms)
ОЛЛ	—	острый лимфобластный лейкоз
ПАУ	—	полициклические ароматические углеводороды
ПВ	—	«промежуточные» мышечные волокна
ПОЛ	—	перекисное окисление липидов
ПОНРП	—	преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты
ПС	—	полиморфные сайты
ПТГ	—	паратиреоидный гормон
ПЦР	—	полимеразная цепная реакция
РМЖ	—	рак молочной железы
РС	—	рассеянный склероз
СД	—	сахарный диабет
СЗВРП	—	синдром задержки внутриутробного развития плода
СПП	—	синдром потери плода
ССЗ	—	сердечно-сосудистые заболевания
ТФ	—	транскрипционные факторы
ТГВ	—	тромбоз глубоких вен
ТЦМ	—	тяжелые цепи миозина
ТЭЛА	—	тромбоз легочной артерии
ФТ	—	факторы транскрипции
ФПН	—	фетоплацентарная недостаточность
ХГ	—	хорея Гентингтона
ЦНС	—	центральная нервная система
Э	—	эндометриоз
ЭКО	—	экстракорпоральное оплодотворение
CNV	—	варьирование числа
HLA	—	главный комплекс гистосовместимости
FDA	—	Food & Drug Administration, USA (Министерство по контролю продуктов и лекарств, США)
GWAS	—	Genome Wide Association Study (полногеномный скрининг ассоциаций)
NO	—	оксид азота
RR	—	relative risk (относительный риск)
SIRTUIN	—	silence information regulators — регуляторы замалчивания информации
STR	—	Short Tandem Repeats — короткие tandemные повторы
VNTR	—	Variable Number Tandem Repeats — переменное число tandemных повторов
GST	—	глутатион-S-трансфераза

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕЦЕНЗЕНТОВ

Мне доставляет большое удовлетворение представить читателю книгу В. С. Баранова с соавторами «Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины» по нескольким причинам. Во-первых, такая книга очень нужна врачам разных специальностей. Во-вторых, написана она высокопрофессионально, причем одновременно с расчетом на широкую врачебную аудиторию и на специалистов-генетиков, которые найдут для себя много новейшей информации, интересных гипотез. В-третьих, книга отличается четко изложенным текстом, положения подтверждаются информативными таблицами и наглядными иллюстрациями.

Медицинская генетика сделала очередной рывок после завершения программы «Геном человека». В генетике последних лет произошли многие события: обнаружены малые РНК и изучается их роль в норме и патологии, расширилось понимание роли эпигенетических процессов, анализируется генетический полиморфизм, вводятся методы полногеномного картирования, широко внедряется технология биочипов. Все это открыло новые возможности изучения труднейших вопросов взаимосвязи наследственности и патологии. Начались активные поиски генов, ассоциированных с широко распространенными заболеваниями. Изучение многофакторных болезней с 1930-х гг. до XXI столетия показало только тот факт, что в их развитии играют роль как наследственные, так и средовые факторы. Классические методы генетики человека не дали возможность перейти эту границу понимания.

Новые технологии генетического тестирования, а именно они являются основой книги, позволяют анализировать интимные механизмы

этиологии и патогенеза многофакторных болезней и на основе генетического тестирования определять большую или меньшую вероятность развития заболевания. Конечно, предсказательная сущность многих тестов еще не абсолютна, но авторы показывают реальные вероятности развития болезней и пути уточнения их предсказательности. Они не навязывают свою точку зрения, а приглашают читателя поразмыслить над итогами тех или иных исследований. Все факты логично увязываются в одну очень правильную, с моей точки зрения, концепцию прогресса медицины — от геномики человека к молекулярной медицине.

Любая книга не может долго содержать исчерпывающую информацию, но данная книга составлена как каркас знаний, легко пополняемый сведениями из текущей литературы, что и будет делать заинтересованный специалист, и в этом ее ценность.

Некоторым моим коллегам не нравится определение «генетический паспорт», но можно назвать это «генетической картой». Речь идет о расширенном генетическом обследовании — от составления родословной до секвенирования генома, а на этих основах и закладывается персонифицированная медицина.

Академик РАМН, профессор Н. П. Бочков

Книга «Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины» подготовлена коллективом авторов под редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора В. С. Баранова. Она является продолжением другой книги практически того же коллектива авторов «Введение в предиктивную медицину», которая вышла в свет в 2000 году. Сравнение этих двух книг представляет несомненный интерес, так как оно позволяет выявить прогресс в той области, которую В. С. Баранов называет иногда превентивной, а иногда предиктивной медициной.

Настоящее рецензируемое издание включает предисловие, введение и 10 глав, а также заключение. Несколько первых глав, в том числе первая «Геном человека и генетический полиморфизм», вторая «Гены, мутации, болезни», третья «Генные сети и гены предрасположенности», четвертая — «Методы анализа генетического полиморфизма» и в определенной мере пятая — «Гены — маркеры мультифакториальных заболеваний», представляют собой основу для понимания того, как выявление ассоциаций между генетическими маркерами разного типа и различными мультифакториальными заболеваниями может быть использовано для пред-

сказания возможности развития у человека с определенным генотипом того или иного мультифакториального заболевания.

Глава 6 называется «Болезни и гены предрасположенности». В ней обобщен обширный материал, в том числе собранный авторами книги, по генетическим ассоциациям, выявленным для широкого круга заболеваний, в том числе бронхиальной астмы, диабета, артериальной гипертензии, остеопороза и ряда форм акушерской патологии. Следует отметить, что поиск ассоциаций между генетическими маркерами, особенно касающийся генов детоксикации и ряда патологических состояний, был, пожалуй, впервые в России предпринят В. С. Барановым и его сотрудниками.

Седьмая глава называется «Новые направления предиктивной медицины». В ней выделены такие разделы, как непривычно звучащая для уха, «нутригеномика», а также фармакогеномика, генетика старения и спортивная генетика. Затем следует глава 8, повторяющая первую часть названия книги, глава 9 «Проблемы генетического тестирования наследственной предрасположенности к МФЗ», которую логично было бы расположить сразу за главой 6 и глава 10 «Этические и правовые аспекты генетического тестирования».

Завершается книга «Заключением», написанным В. С. Барановым. В нем автор останавливается на тех проблемах, которые в настоящее время стоят на пути использования разных видов генетического тестирования в клиническую практику. Таких проблем оказывается немало, начиная с того, что найденные ассоциации с различными заболеваниями вносят небольшой вклад в генетическую компоненту предрасположенности, а их клиническая полезность и достоверность пока остается не доказанной, и кончая тем, что ассоциации, найденные для одних популяций, могут отсутствовать в других.

Хотя рецензент несколько иначе, чем авторы книги, смотрит на перспективы генетического тестирования при мультифакториальных заболеваниях, и он далеко не столь оптимистичен в отношении ближайших перспектив такого подхода, все же он полагает, что книга заслуживает внимания широкого круга специалистов и как современный обзор по генетическому тестированию при МФЗ, и как источник для размышления о современном состоянии генетики мультифакториальных заболеваний и ряда других, примыкающих к этому проблем.

Академик РАМН, профессор Е. К. Гинтер

Весь период осуществления международной программы «Геном человека» сопровождался абсолютной уверенностью в том, что с ее завершением успехи медицины станут революционными, прежде всего, в отношении широко распространенных и социально значимых болезней, т. е. мультифакториальных заболеваний (МФЗ), тридцатью из которых (среди них — коронарная болезнь, артериальная гипертензия, астма, диабет) страдает 65% взрослого населения. Надежды осуществились в отношении редких менделевских болезней — уже разработано около 1000 генетических тестов (ГТ) для более 1200 болезней. Однако отмечается заметная тенденция возрастания интереса к генетическому тестированию при МФЗ, включая идентификацию носительства аллельных вариантов определенных генов, вовлеченных в патогенез этих заболеваний (предиктивная диагностика), а также ответственных за вариабельность реакции на лекарственные вещества (фармакогенетика). Таких примеров в рецензируемой монографии достаточно.

Пиар генетических тестов при МФЗ сегодня соседствует с резкими сравнениями ГТ с гаданием и астрологией, с обличением в некомпетентности ожиданий от применения ГТ для оценки риска заболевания или прогноза эффективности назначенного лечения, с укорами в несоблюдении морально-этических принципов врачевания в условиях неполных знаний о болезнях. В то же время следует заметить, что если мораль и «абсолютное знание» представляют идеальный мир, то клиническая практика — мир реальный. И пациент в этом мире — участник процесса, его информируют и обучают, ему разъясняют и помогают в выборе, о нем заботятся («participatory medicine», Hood, 2008).

Фундаментальные результаты исследований основ МФЗ опираются на анализ генетических ассоциаций, включая полногеномные ассоциативные исследования, мета-анализы, экспериментальные данные. В современных геномных базах имеются сведения о 4–5 тысячах генов и еще большем числе их аллельных вариантов, исследованных в отношении более 2 тысяч болезней мультифакториальной природы.

Вот только два примера тех форм патологии, которым посвящены разделы в данной книге — эндометриоз и остеопороз. В HuGENet базе из 40 тысяч публикаций по генетическим ассоциациям, касающихся генетики эндометриоза — 146, остеопороза — 464 (по сведениям на конец декабря 2008 года); исследовалось 169 генов для остеопороза и 87 генов для эндометриоза. В отношении остеопороза получены воспроизводимые результаты по вариантам ряда генов; они подтверждены 14 мета-анализами, по некоторым локусам обнаружены совпадения с данными четы-

рех полногеномных ассоциативных исследований. Меньше информации в отношении эндометриоза — для этой болезни пока нет полногеномных исследований и существует недостаточное число мета-анализов. Для многих из них получены безукоризненные доказательства ассоциаций. Но эти феногенетические взаимосвязи имеют ряд особенностей: малый вклад в риск развития болезней; заметное увеличение риска заболевания и осложненного течения болезней у носителей комбинаций отдельных генов («ансамбли» генов); наличие общих генов, лежащих в основе патогенеза разных, но нередко сочетающихся МФЗ (синтропии, синтропные и дистропные гены). Они-то и побуждают исследователей к получению новой информации, а также инвентаризации уже имеющейся в интересах пациентов, ради улучшения качества медицинской помощи. ГТ не вместо, а вместе с фенотипическими маркерами могут быть уже сейчас учтены в персонифицированном прогнозе, всегда вероятностном.

Генетическое тестирование МФЗ — это уже практическая технология персонифицированной медицины и вектор усилий по использованию ГТ, на наш взгляд, должен опираться на следующие положения. Во-первых, ГТ — это продвижение навстречу тому, что никогда не определится до конца и никогда не станет простой областью применения и простым предметом изучения. Во-вторых, для успешного продвижения вперед ГТ необходима деконструкция взаимных ожиданий врачей, исследователей и пациентов с ориентацией на кропотливую и добросовестную работу. В-третьих, клиническая практика ГТ должна опираться на доказательную медицину. И это предполагает организацию когортного исследования, в котором когорта — пациенты и их родственники, давшие информированное согласие на ГТ, а нулевая гипотеза — ГТ, осуществляемое разными способами (тестирование аллельных вариантов отдельных генов, использование микрочипов или персонифицированное секвенирование генома), существенно (достоверно) улучшает качество медицинской помощи по прогнозу — предсказание болезни и осложнений либо в ориентации на стиль жизни, либо в выборе оптимальной тактики лечения.

По этим вопросам авторы рецензируемой очень своевременной книги высказывают свои соображения. Она касается современных проблем индивидуализированной терапии. По остроте поднимаемых вопросов и предлагаемым подходам к клиническим приложениям результатов геномных исследований, по объему обобщенного материала — это первая отечественная монография.

Академик РАМН, профессор В. П. Пузырев

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА

В 2000 году нами была опубликована монография «Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину». Санкт-Петербург: «Интермедика», 271 стр. Книга неожиданно быстро исчезла из продажи. Это обстоятельство, свидетельствующее о растущем интересе врачей и широкой общественности к генетике человека и особенно к предиктивной (предсказательной, досимптоматической) медицине, неоднократно наводило на мысль о необходимости переиздания монографии. Однако прогресс в области генетики человека и предиктивной медицины за последние годы был столь стремительным, а объем новой информации таким большим, что стала очевидна необходимость подготовки новой монографии обобщающего характера, отражающей современное состояние проблемы генетического полиморфизма, генетического тестирования и генетического паспорта. При сохранении общего плана исходной монографии данная книга содержит сведения о новых методах, фактах и гипотезах, отражает научные достижения и современный уровень знаний в этой быстро развивающейся и практически важной области молекулярной медицины.

Мы стремились сделать книгу понятной не только специалистам-генетикам, но и врачам разных специальностей, особенно семейным врачам, от активности которых в значительной мере зависит практическое внедрение предиктивной медицины. Надеемся, что книга будет полезна и студентам медицинских институтов, и биологических факультетов университетов, интерес которых к проблемам генетики человека, после того как «прочитан» его геном, резко возрос.

Надеемся, что эта книга будет способствовать дальнейшему прогрессу наметившейся тенденции «генетизации» не только современной медицины, но и всего человечества XXI века — века Генетики.

Выражаю глубокую благодарность и сердечную признательность врачу-генетику лаборатории пренатальной диагностики НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН Марине Валерьевне Кречмар и особенно сотруднику отдела биомедицинской генетики, Университетского медицинского центра г. Утрехта (Голландия) Александре П. Жернаковой за труд по прочтению данной монографии, ценные замечания, дополнения и исправления.

*Член-корреспондент РАМН
В. С. Баранов*

ВВЕДЕНИЕ

Еще в XIX веке классики отечественной науки не сомневались в том, что «будущее принадлежит медицине профилактической» (Я. М. Мудров) и «болезнь легче предупредить, чем лечить» (Н. И. Пирогов). Эти благие пожелания уже в те времена были с энтузиазмом восприняты врачами. Однако в силу скудности данных о молекулярных основах наследственности человека успехи профилактики частых **мультифакторальных (мультифакторных) заболеваний (МФЗ)**, обусловленных действием неблагоприятных факторов внешней среды на фоне наследственно ослабленного генотипа [60], зачастую носили эмпирический характер и были лишены строгой научной основы. Расшифровка генома человека, свершившаяся к апрелю 2003 года в результате успешного завершения одноименной Международной научной программы, знаменовала собой начало новой эры — эры индивидуальной (молекулярной) медицины и ее дочернего профилактического направления — **предиктивной (предсказательной) медицины**.

Современная профилактическая медицина реально возникла только в 1980 году. Ее появление связывают с именем французского ученого Жана Доссе (Jean Dausset), лауреата Нобелевской премии, получившего ее за открытие главного локуса гистосовместимости человека HLA. Именно Ж. Доссе предложил термин **«превентивной» (упреждающей) медицины**. При этом он был убежден в том, что **«чтобы предупредить болезнь, ее надо предвидеть»**. Анализ антигенов, а затем и генов гистосовместимости позволял не только проводить адекватный подбор тканей донора и реципиента, но и, в известной мере, предполагать чувствительность человека к некоторым заболеваниям. Пре-

диктивная роль тестирования генов *HLA* оказалась весьма скромной. Значительно более весомые аргументы в пользу предсказательной медицины появились в процессе расшифровки генома человека. Медицинские перспективы **«предиктивного генетического тестирования» (predictive genetic testing)** неоднократно подчеркивались директором международной программы «Геном человека» Фрэнсисом Коллинзом. В отечественной литературе термин **«предиктивная медицина»** стал применяться с середины 90-х годов прошлого века [144, 698]. Ее основные положения были сформулированы, обобщены и опубликованы в нашей монографии «Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину», опубликованной в 2000 году [30]. Современную предиктивную медицину рассматривают как одно из важных профилактических направлений **молекулярной медицины**, которая **решает проблемы диагностики, профилактики и лечения на уровне нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и их продуктов — белков, ферментов**. Ее основные отличительные особенности: **индивидуальный характер и профилактическая направленность**. Предиктивная медицина не может не быть индивидуальной (персонифицированной), так как геном каждого человека уникален. Данные об индивидуальных особенностях генома, то есть его ДНК, могут быть получены на любой стадии развития организма, задолго до манифестации заболевания. Это открывает широкие возможности для **первичной, досимптоматической диагностики наследственной предрасположенности к болезни и, соответственно, для ее ранней (первичной) профилактики**.

Развитие предиктивной медицины происходит параллельно с расшифровкой генома человека. К апрелю 2003 года, когда было официально объявлено об успешном завершении Международной программы Геном человека, уже были идентифицированы практически все гены, мутации которых приводят к **моногенным болезням**, охарактеризованы спектры мутаций, выявлены мажорные (доминирующие) варианты мутаций соответствующих генов, разработаны оптимальные методы и алгоритмы молекулярной диагностики [39]. Обзор современных данных о структуре генома человека, об идентификации новых генов, удивительных находках и замечательных достижениях **функциональной геномики XXI века** приведен в **главе 1**.

Особенно впечатляющими являются успехи генетики последних лет в изучении **МФЗ**. Решающее значение в этом имели исследования природы и фенотипических проявлений **генетического полиморфиз-**

ма — индивидуальных особенностей структуры генома. Известно, что секвенирование геномов у представителей разных рас и этнических групп выявило удивительное сходство первичной структуры их ДНК. Геномы всех людей оказались тождественными по своему нуклеотидному составу почти на 99,9%! Варьирование по числу и распределению в хромосомах повторяющихся последовательностей ДНК и, главное, **единичных однонуклеотидных замен** (SNP — single nucleotide polymorphisms), встречающихся примерно через каждые 290 пар оснований (п. о.), составляют основу **индивидуальной изменчивости (вариабельности)**. Число уже идентифицированных SNP постоянно возрастает: от 4 миллионов в 2003 году до почти 9 миллионов в 2007-м. Полиморфные участки, особенно SNP, нередко локализуются в смысловых частях генов (экзонах). При этом они меняют генетический код, что приводит к заменам аминокислот в пептидах. Следствием такого **генетического полиморфизма** являются белки (ферменты) с разной функциональной активностью. Исследуя молекулярную структуру полиморфных локусов, в том числе SNP, можно получить информацию об уникальных молекулярных особенностях каждого человека. **Генетический полиморфизм — основа индивидуальной изменчивости, причина биохимической уникальности каждого человека, источник индивидуальных различий в предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям.**

Общие представления о структуре генов, мутациях, генетическом полиморфизме и их фенотипических проявлениях (моногенные и МФЗ) приведены в **главе 2**.

Другая составляющая современной предиктивной медицины — **биоинформатика**, сделавшая возможным идентификацию **генных сетей** нормального и патологического метаболизма. **Генная сеть — группа координированно экспрессирующихся генов и их продуктов, контролирующих тот или иной процесс морфогенеза или определенные функции организма** [110]. Достаточно полная характеристика генных сетей процессов нормального морфогенеза, а также ряда МФЗ, идентификация генов, составляющих эти сети, и анализ их полиморфизма сыграли важную роль в прогрессе предиктивной медицины. Особенно плодотворной в этом отношении оказалась идея **генов предрасположенности**. Развитие любого патологического процесса (МФЗ) определяется не всем геномом, и даже не всеми генами отдельной генной сети, но лишь сравнительно немногими из них — **генами предрасположенности**.

Аллельные варианты этих генов вполне совместимы с ante- и постнатальным развитием, но при определенных неблагоприятных условиях могут способствовать развитию того или иного заболевания. Тестирование полиморфизма (аллельных вариантов) генов предрасположенности составляет методическую основу предиктивной медицины. Типичные гены предрасположенности — это гены системы детоксикации, свертывания крови, функции эндотелия, липидного обмена, иммунной защиты, остеогенеза и др. Проблемам неслучайной ассоциации определенных аллелей этих генов с наиболее распространенными мультифакториальными заболеваниями, возможным путям их предупреждения с помощью **упредительного тестирования** генов ряда особенно важных метаболических систем организма посвящена **глава 3**.

Учитывая стремительно нарастающее число уже идентифицированных генов-маркеров, ассоциированных с различными заболеваниями, масштабность тестирования в генетике человека и молекулярной (предиктивной) медицине, особую важность приобретает разработка и внедрение новых, точных и высокоэффективных методов идентификации маркерных генов и анализа их полиморфизма. Уже существующие и некоторые новые методы анализа генетического полиморфизма, прежде всего, метод **биочиповой технологии**, в том числе его современная модификация — **технология общегеномного скрининга ассоциаций**, позволяющие проводить исследования как в масштабе отдельных генных сетей, так и всего генома, впечатляющий прогресс новых методов секвенирования генома рассмотрены в **главе 4**.

Для краткости изложения и удобства пользования справочной информацией в **главе 5** суммированы наиболее известные гены-маркеры и их функционально значимые аллельные варианты, которые обеспечивают важнейшие метаболические процессы организма (детоксикация ксенобиотиков, обмен липидов, энергетический обмен, иммунный ответ, воспалительные реакции и другие). Гены-маркеры систематизированы по группам, соответствующим генным сетям различных МФЗ.

В наиболее объемной **главе 6** рассмотрены мировые данные и результаты собственных многолетних исследований по изучению генов-маркеров и их аллельных вариантов при некоторых распространенных МФЗ, таких как бронхиальная астма, диабет, остеопороз, артериальная гипертензия, нейродегенеративные заболевания и при акушерско-гинекологической патологии (эндометриоз, привычное невынашивание, тромбофилия, гестоз).

Основы новых направлений предиктивной медицины, возникших и бурно развивающихся в последние годы, таких как **нутригеномика** (взаимодействие между пищевыми продуктами и генами), **фармакогеномика** (взаимодействие между генами и лекарствами), **спортивная геномика**, а также **геронтогеномика** (вклад различных генов в процессы старения) изложены в **главе 7**.

Логичным следствием исследования генов-маркеров являются индивидуальные базы ДНК-данных, информационная ценность которых тем выше, чем больше протестировано аллельных вариантов генов предрасположенности. Общим представлением о **генетическом паспорте**, идея которого впервые была озвучена нами еще в 1997 году и неоднократно являлась предметом подробного обсуждения [30, 34, 39], его дальнейшему развитию в виде специализированных баз данных (**Генетическая карта репродуктивного здоровья, Генетическая карта ребенка, спортсмена** и пр.) посвящена **глава 8**.

Проблемы, возникающие при тестировании аллельных ассоциаций генов-маркеров с определенными МФЗ, и особенно при интерпретации результатов предиктивного генетического тестирования наследственной предрасположенности к МФЗ, рассмотрены в **главе 9**.

Социально-этические, юридические и некоторые правовые аспекты генетического тестирования вообще, и особенно в случае предиктивного (упреждающего) тестирования наследственной предрасположенности, отражены в **главе 10**.

В **заключении** суммированы наиболее важные достижения предиктивной медицины за последние семь лет. Отмечается, что данное направление сегодня все еще находится на этапе активного накопления информации. Большинство исследований носят ретроспективный характер, а сама полезность досимптоматического генетического тестирования все еще ждет клинического подтверждения отдаленных результатов. Пока такие исследования в своем подавляющем большинстве ограничены сравнением аллельных частот генов предрасположенности у больных и у здоровых доноров. Малорепрезентативные выборки больных, недостаточно строго подобранные варианты случай–контроль, выраженные популяционные различия аллельных частот изучаемых полиморфных маркеров и отсутствие обобщающего мета-анализа для подавляющего большинства изученных генов создают значительные сложности в оценке полученных результатов, и особенно для их клинической интерпретации. К сожалению, масштабные проспектив-

ные исследования, доказывающие практическую значимость предиктивного генетического тестирования, пока отсутствуют. Тем не менее, опыт быстро набирается и внушает уверенность в правильности данного подхода. Быстрого прогресса в этой области можно ожидать от широкого внедрения технологии общегеномного скрининга ассоциаций, позволяющей проводить сравнение геномных профилей больных и здоровых сразу по многим тысячам полиморфных сайтов и с уверенностью идентифицировать главные гены-маркеры. Нет сомнения в том, что именно предиктивной медицине принадлежит будущее в области ранней диагностики, первичной профилактики и лечении многих частых болезней. Не вызывает сомнения ее решающий вклад и в решение многих актуальных проблем современной медицины: персонифицированную лекарственную терапию (фармакогенетика, фармакогеномика), профилактику частых МФЗ (кардиогеномика, онкогеномика, остеогеномика и др.), старение и активное долголетие (геронтогеномика, нутригеномика, дерматогеномика и др.). Заслуживает внимания и всемерной поддержки идея генетического паспорта, внедрение которого еще требует существенной юридической и правовой проработки. В конечном счете успех предиктивной медицины полностью зависит от широкого внедрения достижений генетики в практическое здравоохранение, от тесного союза генетиков и врачей других специальностей. Уже сегодня все четче просматриваются реальные контуры будущей **синтетической медицины**, основанной на знании индивидуального генома человека и понимании особенностей его реакций на действие разнообразных, в том числе и повреждающих факторов внешней среды. По мнению некоторых авторитетных западных специалистов (Лерой Гуд, США, Leroy Hood), медицина XXI века будет **предиктивной (предсказательной), превентивной (упреждающей), персонифицированной (индивидуальной) и партисипированной (предусматривающей активную роль самого пациента)**, так называемая «4 П Медицина». Научить человека жить в гармонии со своими генами — только первый этап практического внедрения предиктивной медицины, ее основная стратегическая цель — обеспечить максимально эффективное использование геномики для здоровья человека.

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ

ВВЕДЕНИЕ

Термин «**геном**» появился в 1920 году и первоначально был предложен немецким ученым Г. Винклером для определения гаплоидного набора хромосом. В настоящее время этот термин широко используется для обозначения всего наследственного материала клетки. Таким образом, **геном — это наследственный аппарат клетки, содержащий весь объем информации, необходимой для развития организма, его существования в определенных условиях среды, эволюции и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений.** Наука, изучающая молекулярную структуру и функции геномов живых организмов, получила название «**геномика**».

Основу генома человека составляет молекула ДНК — знаменитая «нить жизни», двуспиральная структура которой была гениально предсказана и научно обоснована в работе нобелевских лауреатов Джеймса Уотсона и Фрэнсиса Крика еще в 1953 году. Спираль состоит из **4 пар оснований (нуклеотидов): двух пуринов (аденин, гуанин) и двух пиримидинов (тимин, цитозин),** связанных между собой через дезоксирибозу и остатки фосфорной кислоты в длинную нить. При формировании двойной спирали обе нити ДНК соединяются между собой посредством водородных связей между нуклеотидами, причем так, что аденин всегда соединен с тимином, а гуанин — с цитозином. Соотношение пуринов (аденина и гуанина) и пиримидинов (тимина и цитозина) в молекуле ДНК всегда одинаково и равно единице. Еще до появления модели двойной спирали ДНК на эту закономерность обра-

тил внимание американский ученый Эрвин Чаргафф (так называемое «правило Чаргаффа»). В дальнейшем было доказано, что именно в чередовании пар оснований в молекуле ДНК и заложен генетический код для каждой из 20 незаменимых аминокислот, из которых построены все белки организма. Этот генетический код трехбуквенный, то есть каждой аминокислоте соответствуют свои три нуклеотида, свой **триплет**. Длина молекулы ДНК в каждой клетке человека составляет около 1,5–1,7 метров. Число нуклеотидов всей уникальной «нити жизни» равно приблизительно 3,3 миллиарда пар оснований (п. о.), по последним данным, $3,1647 \times 10^6$ п. о.

Фрагменты ДНК этой нити и являются тем, что называется **генами**, то есть **кодирующими участками генома, определяющими структуру пептидных цепей, образующих все белки организма**. Получение точных данных о структуре генома, то есть о **первичной последовательности** нуклеотидов, количестве генов у человека и их организации в хромосомах, — эти вопросы давно привлекали и продолжают привлекать внимание ученых — молекулярных биологов.

Уже в 1986 году Министерством энергетики США были выделены крупные средства на изучение генома человека. У истоков этих исследований стоял известный биофизик Чарльз Контор. В 1990 году активным инициатором и пропагандистом программы «Геном человека» стал знаменитый Джеймс Уотсон, а главным распорядителем финансов — Национальный институт здоровья США, в составе которого в 1995 году появился Национальный институт исследования генома человека, который возглавил Фрэнсис Коллинз. В этом же году он стал и руководителем международной программы «Геном человека», к которой присоединились ведущие молекулярные лаборатории Великобритании, Франции, Германии, Японии и России. Решающая роль в становлении и развитии одноименной отечественной подпрограммы принадлежит выдающемуся ученому академику А. А. Баеву [25].

Основной задачей программы «Геном человека», сформулированной Ч. Контором, было создание генетической, физической и **сиквенсной карт**. При этом под **сиквенсом (sequence)** понималась **расшифровка точной первичной последовательности нуклеотидов всей гигантской (1,5–1,7 м) молекулы ДНК**. С этой целью были разработаны специальные методы **секвенирования ДНК**. Первоначально программа была запланирована на 15 лет. Ее стоимость оценивалась в 3 млрд долларов: цена одного шага, то есть

установление положения одного нуклеотида в цепи ДНК, составляла тогда 1 доллар. Однако серьезные технические и методические усовершенствования позволили автоматизировать процесс секвенирования, сделать его более эффективным, быстрым и экономичным. В результате уже в июне 2000 года было объявлено о завершении первого этапа программы — создании «чернового варианта» генома человека. Уместно отметить, что честь этого эпохального достижения мировой науки, наряду с международной командой, которая включала в себя около 1100 ученых разных стран из 160 научных центров, принадлежит и частной фирме **Celera Genomics**, преобразованной в 1998 году в Институт геномных исследований (TIGR) под руководством известного американского ученого Крэйга Вентера. «Черновой вариант» расшифровки генома человека был опубликован этими центрами в февральских номерах ведущих научных журналов “Nature” (Feb. 15, 2001) и “Science” (Feb. 16, 2001). Они во многом совпадают, хотя и имеют некоторые отличия. Приведенные в них результаты находятся в открытом доступе: www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html.

Полностью секвенирование генома человека было завершено к апрелю 2003 года — к 50-летию юбилею открытия двойной спирали Дж. Уотсоном и Фр. Криком. Информация по всем исследованиям по программе «Геном человека» и ее дочерним направлениям широко представлена в Интернете (табл. 1.1). Особенно удобны для работы — www.ensembl.org или <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>, которые выходят на геном человека, открытый для свободного доступа. Они позволяют посмотреть последовательность нуклеотидов в любом участке генома.

1.1. ОСНОВНЫЕ ИТОГИ ПРОГРАММЫ «ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА»

Следует еще раз отметить, что в силу беспрецедентной гонки за первенством, «черновой» вариант генома человека был опубликован еще в 2001 году, второй, окончательный — в апреле 2003 года. После этого программа официально перестала существовать, но работы по дальнейшему изучению тонкой молекулярной структуры генома человека, по секвенированию геномов различных животных, и в том числе биологических моделей, активно продолжаются.

Основные уже известные характеристики генома человека суммированы в таблице 1.2.

Таблица 1.1

Основные адреса Интернета по программе «Геном человека» (ПГЧ)

Доступ к общей информации	http://www.ornl.gov/hgmis
Национальный Институт по исследованию генома человека	http://www.nhgri.nih.gov
Национальный центр биотехн. информации NCBI (OMIM)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
Геномика — наукам о жизни	http://doegenomestolife.org
ПГЧ и экология	http://www.niehs.nih.gov/envgenom/home.htm
Анатомия генома человека и рак	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap
SNP-консорциум	http://snp.cshl.org
Медицина и новая генетика	http://www.ornl.gov/medicine/medicine.html
Геном и предиктивная медицина	http://www2.cdc.gov/nceh/genetics
Геном, медицина и общество (справочное издание)	http://www.ornl.gov/hgmis/launchpad
Этические, юридические и социальные аспекты ПГЧ	http://www.ornl.gov/hgmis/elsi/elsi.html
«Черновой вариант» генома	http://www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html
ПГЧ для преподавателей	http://www.ornl.gov/hgmis/education/education.html
ПГЧ для студентов	http://www.ornl.gov/hgmis/education/students.html

Следует обратить внимание на то, что к 2003 году был секвенирован не весь геном, а только около 90% первичной нуклеотидной последовательности ДНК **эухроматических (слабо окрашивающихся красителем Гимза или флюорохромами) районов хромосом, где сосредоточено основное число генов.** Размер эухроматической части генома составляет около 2,9 млрд п. о. Технически наиболее сложными для секвенирования оказались сателлитная ДНК **теломерных (концевых) и околоцентромерных** участков хромосом, сильно спирализованные области **интеркалярного (внутрихромосомного) гетерохроматина (районы ярко окрашивающиеся красителем Гимза или флюорохромами),** а также небольшие интерстициальные фрагменты, так называемые **гэпы (gap) — «пустые» промежутки.** Эти участки генома (около 400 фрагментов) к 2003 году еще оставались нерасшифрованными.

Таблица 1.2

Основные характеристики генома человека (данные на 2006 г.)

I. Общие показатели	
Общая длина молекулы ДНК	1,5–1,7 м
Число нуклеотидов	$3,1647 \times 10^9$
в эухроматине	$2,900 \times 10^6$
в гетерохроматине	$0,3 \times 10^6$
II. Основные результаты секвенирования	
Просеквенировано (установлена первичная последовательность нуклеотидов)	99% эухроматина
Допустимая частота ошибок	1×10^{-4}
Частота ошибок секвенирования хромосом 1, 21, 22, X	1×10^{-6}
Несеквенировано	10%
III. Общая структура ДНК генома	
Повторяющиеся последовательности	45–50%
Транскрибируемая часть всего генома	28–30%
всего транскрибируется до РНК	23–25%
транслируется до белков (экзонная часть генома)	5%
Кодирует синтез всех белков организма	1,2% всей ДНК
«Факультативная» ДНК (LTR, SINE, LINE, Transposones)	50%
Минисателлитная ДНК + Микросателлитная ДНК	3%
IV. Генетический полиморфизм	
Идентичность геномов разных индивидов 2003/2006	99,9/99,0%
Межиндивидуальная вариабельность	0,1/10%
Общее число однонуклеотидных замен (SNP)	$10-12 \times 10^6$
Число «значимых» (внутригенных) SNP	$3-5 \times 10^6$
Число картированных SNP в HarMap 2006	$5,5 \times 10^6$
V. Число генов	
Всего	22 000
Неизвестные транскрибируемые последовательности	5 286
Идентифицировано генов	20 000
Картированы на хромосомах OMim, 17 августа 2007 г.	10 336
Гены моногенных заболеваний	1 485
Хромосома 1 OMIM /другие источники	1000/3141
Хромосома 21 OMIM /другие источники	133/225
Хромосома 22 OMIM /другие источники	257/525
X-хромосома OMIM /другие источники	578/1098

Второе ограничение связано с тем, что к 2001 году были просеквенированы геномы лишь нескольких человек, и точность секвенирования отдельных участков была ниже «золотого стандарта» качества — одна ошибка на 10^4 п. о. К настоящему времени уже просеквенированы геномы более 10 человек. При этом 30 % генома человека секвенировано 8–10 раз с точностью 99,99 % в полном соответствии с «золотым стандартом». В мае 2007 года полная карта личного генома была торжественно вручена знаменитому Джеймсу Уотсону. Несколько позже полные карты своих геномов получили Крэйг Ветнтер и Джон Черч (см. гл. 8).

В 2000 году двумя большими международными группами были просеквенированы с более высокой точностью — одна ошибка на 10^6 п. о., — только 21 и 22 хромосомы, а в 2006 году полностью завершена расшифровка молекулярной структуры 1 хромосомы и X-хромосомы [746, 747].

Важнейшим итогом создания «чернового варианта» генома стало достаточно точное определение общего числа генов человека. Первоначально оно оценивалось величиной 30–35 тысяч. В настоящее время считается, что геном человека содержит примерно 22 000 генов. Большая часть из них (около 20 000) уже идентифицирована, и свыше 11 000 генов картированы на хромосомах. Ежедневно обновляемую информацию о картированных генах человека можно получить в Интернете на сайте OMIM NCBI GenBank (табл. 1.1). Всего на 16 августа 2007 года в этом каталоге зарегистрировано 17 848 признаков, 16 736 локализованы на аутосомах, 993 — на X-хромосоме и только 56 — на Y-хромосоме.

Согласно последним данным по расшифровке молекулярной структуры 1-й пары хромосом человека, в ней находится 3 141 ген, 950 **псевдогенов (гены, утратившие вследствие мутаций способность к экспрессии)**. С этой хромосомой связывают в настоящее время свыше 350 наследственных заболеваний и многие злокачественные новообразования [746]. Число генов на достаточно крупной по размерам X-хромосоме оценивается величиной 1098, из которых 99 контролируют репродуктивную функцию или ассоциированы с раком [747].

Важно отметить, что уже к 2001 году были идентифицированы, клонированы и изучены на наличие мутаций гены практически всех наиболее частых (около 320) и 170 генов более редких наследственных заболеваний [638]. К 2003 году были идентифицированы и исследованы на наличие мутаций гены 1485 болезней человека [620].

Заслуживает внимания тот факт, что в геноме человека наряду с обычными по структуре генами идентифицированы еще 5286 транс-

крибируемых последовательностей ДНК [239]. Являются ли эти фрагменты настоящими генами и какова их функция остается загадкой.

Нетрудно предвидеть быстрый рост объема информации о тонкой молекулярной структуре генома человека уже в ближайшем будущем. Порукой тому является стремительный прогресс методов секвенирования ДНК. Если начальная стоимость проекта оценивалась в 3 миллиарда долларов США, то уже сегодня компания Celera Genomics предлагает это сделать всего за несколько миллионов долларов. В недалеком будущем некоторые американские компании (454 Life Science, Helicos BioSciences), а также английская Solex смогут проводить высокоточное секвенирование генома всего за несколько месяцев при стоимости всего около 100 тысяч долларов. Предполагается, что в течение ближайших 5–10 лет стоимость секвенирования индивидуального генома снизится до 1000 долларов и по времени будет занимать всего несколько дней [214, 653]. И сегодня речь идет уже не о гапloidном геноме человека, сиквенс которого был целью программы «Геном человека», а о секвенировании сразу двух нитей ДНК. Это позволит получить информацию о нуклеотидном составе обеих нитей ДНК (параллельной и антипараллельной) и, соответственно, судить о всех аллельных вариантах любого гена.

Таким образом, хотя официально программа «Геном человека» завершилась, исследование генома человека активно продолжается. При этом особый интерес вызывают вопросы функциональной организации генома и проблемы генетического полиморфизма.

1.2. ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И ДРУГИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ГЕНОМИКИ

Триумфальное завершение программы «Геном человека» имело огромный научный и общественный резонанс. Уже в середине 90-х годов XX века возникли и получили развитие новые научные направления: «Сравнительная геномика» (I); «Функциональная геномика» (II), «Разнообразие геномов человека» (III), «Социальные, этические и правовые аспекты генома человека» (IV) [30, 31, 32, 55, 74, 100, 117, 154, 167, 361, 623]. Схема их взаимодействий представлена на рисунке 1.1.

Новые направления геномики активно проникают во все сферы жизни человека. Уже сегодня с полным основанием можно констатировать начало нового исторического периода жизни человечества — эры «Всеобщей Генетизации». Главные из этих направлений, а также некоторые

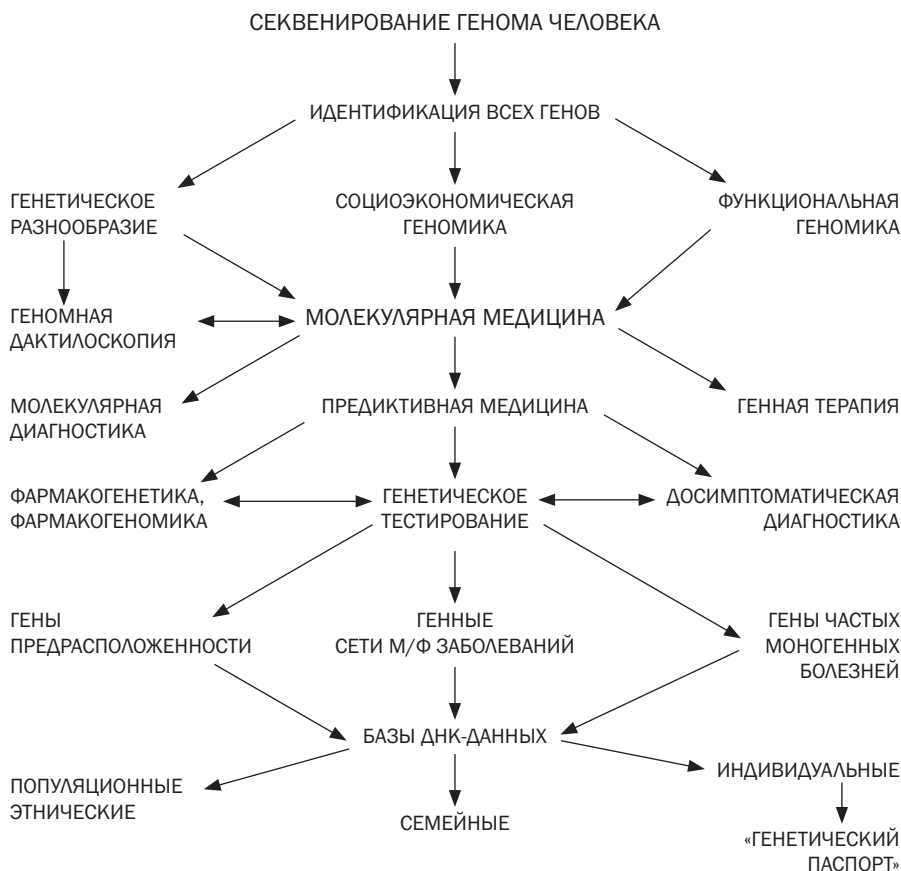
Геном человека и генетизация человечества XXI века

Рис. 1.1. Схема новых научных и прикладных направлений, возникших в процессе выполнения программы «Геном человека»

перспективные новые научные проекты, уже выполняемые как продолжение исследований генома человека, рассмотрены в данном разделе.

1.2.1. Сравнительная геномика

К настоящему времени кроме человека просеквенированы геномы многих других организмов. В этом списке — более тысячи бактерий, дрожжей, дрозофила, аскарида, японская рыбка *Pufo*, растения (горчицная трава, рис), курица и млекопитающие (лабораторная мышь, крыса, собака, шимпанзе, сумчатый опоссум). Основные характеристики гено-

мов этих организмов приведены на сайте www.genome.gov/10002154. Наличие такой информации открывает возможности для сравнительного компьютерного анализа геномов разных организмов, что важно для понимания процессов эволюции, для картирования генов, для создания универсальной «геномной» системы классификации живых организмов. Сходство геномов человека и других млекопитающих превышает 90 %. Более того, установлено, что у человека и у дрозофилы примерно 60 % всех **генов ортологичны**, то есть **являются гомологами**. Методами сравнительной геномики установлена высокая гомология человека и шимпанзе (сходство более 96 %), соответственно, по-новому трактуются вопросы эволюции человека.

Весьма любопытны последние данные о сравнении геномов человека и филогенетически древнего сумчатого млекопитающего — опоссума. Несмотря на то, что филогенетически эти виды отстоят друг от друга более чем на 180 млн лет, разница между их геномами в кодирующих областях не превышает 1 %, а в консервативных, некодирующих областях — 20 %. Сравнительный анализ этих геномов доказывает важную роль **транспозонов (вирусоподобных ДНК-последовательностей, способных перемещаться по геному)** в процессах эволюции плацентарных млекопитающих [600]. Методами сравнительной геномики выявлены гены, играющие важную роль в познавательной (когнитивной) деятельности. Так, обнаружен ранее неизвестный ген *MGC8902*, который активно **экспрессируется** в отделах головного мозга, ответственных за когнитивную деятельность. Ген представлен сотнями копий (> 200) в геноме человека, 37 копиями у шимпанзе и единичными копиями у крыс и мышей [500].

Есть основания предполагать, что со временем компьютерный анализ геномов различных животных позволит создать Периодическую систему геномов всех живых организмов [698]. Будет ли она по аналогии с известной Периодической системой химических элементов Д. И. Менделеева двухмерной или окажется многомерной, покажет будущее. Однако сама возможность создания такой биологической Периодической системы сегодня уже не представляется фантастичной [560]. Рассмотрение вопросов филогенеза и систематики живых организмов, исходя из структуры их геномов, выходит за пределы тематики данной монографии.

1.2.2. Функциональная геномика

В то время как основные задачи геномики ограничиваются исследованиями структуры генома, идентификацией генов, исследованиями

мутаций и полиморфизма и другими аспектами «анатомии» генома, **функциональная геномика** сосредоточена на изучении проблем работы генома. Отсюда такие новые направления геномики: **транскриптомика** — масштабный анализ мРНК для выяснения того, когда, где и при каких условиях **транскрибируются** (считываются) гены; **протеомика** — исследование синтеза и функции белков; **структурная геномика** — исследование 3-мерной структуры белка (белков) для более полного понимания его (их) функций [117].

По мере стремительного увеличения числа известных генов, все более очевидным становится недостаток имеющихся данных об их функциях, о функциональной значимости тех белков, которые они кодируют. Из более 20 тысяч генов, уже идентифицированных на физической карте генома человека, на сегодняшний день функционально изучены не более 10–11 тысяч (табл. 1.1). Что они делают? Каковы функции остальных генов — совершенно неизвестно.

Методы направленного мутагенеза эмбриональных стволовых клеток с целью получения биологических моделей наследственных болезней — лабораторных животных (мышей) [86]; создание банков кДНК различных тканей и органов на разных стадиях онтогенеза; разработка методов изучения функций участков ДНК, не кодирующих белки; развитие новых технологий, позволяющих проводить сравнительный анализ экспрессии многих тысяч генов — вот существующие подходы для идентификации новых генов и выяснения их функций [230, 764].

Предполагается, что в ходе создания полного генного портрета человека будет идентифицировано примерно 200–300 тысяч белков (один ген принципиально может обеспечивать синтез нескольких разных белков). Выяснить появление таких белков в онтогенезе, исследовать **«экспрессионный профиль»** тысяч генов с целью мониторинга состояния клеток и тканей в норме и при различных заболеваниях — центральная задача функциональной геномики в уже наступившую **постгеномную эру** [117]. Решение ее непосредственно связано с проблемами молекулярной медицины (см. 1.2.5), с появлением и развитием новой синтетической медицины, представляющей собой сплав геномики и протеомики (см. Заключение).

Как было установлено еще в «юбилейном» варианте генома человека (табл. 1.2), только 1,2% всей последовательности ДНК кодирует структуру всех белков организма. Еще 15–30% приходится на ДНК, транскрибируемую только до РНК. Последняя регулирует активность

генов и хромосом, обеспечивает **процесс трансляции — передачу информации с информационных РНК на аминокислотную последовательность полипептидных цепей, синтезируемых на рибосомах**. Наряду с этим, около 50 % ДНК генома представлено повторяющимися последовательностями различной протяженности. Это так называемые «факультативные элементы генома» [471]. Последние включают высокоповторяющиеся фрагменты ДНК **гетерохроматина**, вирусоподобные по своей структуре мобильные элементы (**транспозоны**), а также короткие 1–13 п. о. — **микросателлитные** и более протяженные (14–500 п. о.) — **минисателлитные** ДНК-повторы. Функции этой факультативной ДНК окончательно не известны. В конце 2002 года при сравнительном компьютерном анализе геномов человека и лабораторной мыши было сделано поразительное открытие, позволившее предположить, что именно в повторяющихся последовательностях геномной ДНК закодирована информация, обеспечивающая всю программу индивидуального развития, то есть всю партитуру «симфонии жизни», проигрываемой на молекуле ДНК. Не исключено, что многие из таких «**факультативных элементов генома**» ответственны за синтез малых «ядерных» РНК, так называемых микроРНК типа dsRNS или siRNA, регулирующих работу многих генов [114, 394]. Важная роль транспозонов в эволюции генома и регуляции функции генов является предметом активного изучения [774]. В настоящее время налажено коммерческое производство наборов коротких РНК, пригодных для направленного выключения работы (экспрессии) самых различных генов человека и биологических моделей (мыши, крысы). Такие наборы имеют значение не только для научных исследований, но и для практического применения в медицине, прежде всего в онкологии, а также для лечения некоторых наследственных болезней [SuperArray Bioscience — www.superarray.com].

Возможность направленной регуляции функции генов с помощью коротких РНК представляется особенно важной уже сегодня, когда достаточно хорошо разработана и уже используется технология экспрессионных чипов, позволяющая количественно оценивать экспрессионные профили всех генов, работающих в разных тканях и органах [764].

Другие важные новации последних лет, непосредственно относящиеся к функциональной геномике, касаются расшифровки функционального (**эпигенетического**) кода для каждой ткани развивающегося зародыша и органа. На молекулярном уровне это означает исследование особенностей **метилования/деметилования** ДНК (инактивации/

активации генов) и создание соответствующих **«экспрессионных карт генов»** для разных тканей на разных стадиях развития организма. Такой научный проект, финансируемый в рамках стран Европейского сообщества, уже реализуется (EU — funded Human Epigenome Project) [326].

В области функциональной геномики заслуживает внимания сообщение об открытии так называемого **«гистонового» кода**, помимо уже известных генетического и эпигенетического кодов. Гистоновый код определяет включение и выключение отдельных генов и целых ДНК-локусов путем изменения их химической структуры (фосфорилирования, ацетилирования, метилирования) **гистонов** — низкомолекулярных белков, обеспечивающих компактизацию нити ДНК, ее структурно-функциональное состояние [579].

Таким образом, расшифровка первичной молекулярной структуры генома человека не только существенно расширила наши представления о природе этого универсального носителя наследственной информации, но и привела к новым открытиям, принципиально изменившим наши представления о его структурно-функциональной организации.

1.2.3. Генетический полиморфизм

Генетическая вариабельность, ограниченная одним видом (*Homo sapiens* в нашем случае), получила название **генетического полиморфизма (ГП)**.

Геномы всех людей, за исключением однояйцевых близнецов, различны. Выраженные популяционные, этнические и, главное, индивидуальные различия геномов как в их **смысловой части (экзоны)**, так и в их **некодирующих последовательностях (межгенные промежутки, интроны и прочее)** обусловлены различными мутациями, приводящими к ГП. Последний обычно определяют как **менделевский признак, встречающийся в популяции по крайней мере в 2 вариантах с частотой не менее 1 % для каждого** [209]. Изучение ГП является основной задачей быстро набирающей силы программы «Генетическое разнообразие человека» (см. табл. 1.1).

ГП может быть **качественным**, когда происходят замены нуклеотидов, либо **количественным**, когда в ДНК варьирует число нуклеотидных повторов различной протяженности. Тот и другой виды ГП встречаются как в смысловых (белок-кодирующих), так и во внегенных последовательностях молекулы ДНК.

Качественный ГП — представлен преимущественно однонуклеотидными заменами, так называемыми *single nucleotide polymorphism* (SNP) [800]. Это самый частый ГП. Уже первое сравнительное изучение геномов у представителей разных рас и этнических групп показало не только глубокое генетическое родство всех людей (сходство геномов — 99,9%), но и позволило получить ценную информацию о происхождении человека, маршрутах его расселения по планете, о путях этногенеза. Решение многих проблем геногеографии, происхождения человека, эволюции генома в филогенезе и этногенезе — вот круг фундаментальных проблем, стоящих перед этим быстро развивающимся направлением [81, 129, 212].

Количественный ГП — представлен вариациями числа tandem-ных повторов (STR — Short Tandem Repeats) в виде 1–2 нуклеотидов (микросателлитная ДНК) либо 3–4 и более нуклеотидов на коровую (повторяющуюся) единицу. Это так называемая минисателлитная ДНК. Наконец, повторы ДНК могут иметь большую протяженность и переменную по нуклеотидному составу внутреннюю структуру — так называемые VNTR (Variable Number Tandem Repeats).

Как правило, количественный ГП касается бессмысловых не-кодирующих (кодовых) участков генома. Исключение составляют только тринуклеотидные повторы. Чаще это CAG (cytosine–adenine–guanine) — триплет, кодирующий глутаминовую кислоту. Они могут встречаться и в кодирующих последовательностях ряда структурных генов. В частности, такие ГП характерны для генов «болезней экспансии» (см. главу 3). В этих случаях по достижении определенной копийности тринуклеотидного (полинуклеотидного) повтора ГП перестают быть функционально нейтральными и проявляют себя как особый тип так называемых «динамических мутаций» [86, 107, 173]. Последние особенно характерны для большой группы нейродегенеративных заболеваний (хорея Гентингтона, болезнь Кеннеди, спиноцеребеллярная атаксия и др.). Характерными клиническими особенностями таких заболеваний являются: поздняя манифестация, эффект антиципации (усиления тяжести заболевания в последующих поколениях), отсутствие эффективных методов лечения (см. главу 3).

Все люди, населяющие сегодня нашу планету, действительно являются генетически братьями и сестрами. Более того, межиндивидуальная вариабельность даже при секвенировании генов представителей белой, желтой и черной рас не превысила 0,1 % и обусловлена, главным обра-

зом, **однонуклеотидными заменами, ОНЗ — SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)**. Такие замены весьма многочисленны и встречаются через каждые 250–400 п. о. Их общее число в геноме оценивается в 10–13 миллионов (табл. 1.2). Предполагается, что около половины всех SNP (5 млн) приходится на смысловую (экспрессирующуюся) часть генома. Именно эти замены, как оказалось, особенно важны для молекулярной диагностики наследственных болезней. Им принадлежит основная роль в ГП человека [30, 86, 172, 173].

На сегодняшний день хорошо известно, что полиморфизм характерен практически для всех генов человека. Более того, установлено, что он имеет выраженную этническую и популяционную специфику. Эта особенность позволяет широко использовать полиморфные генные маркеры в этнических и популяционных исследованиях [129]. Полиморфизм, затрагивающий смысловые части генов, нередко приводит к замене аминокислот и к появлению белков с новыми функциональными свойствами. Существенное влияние на экспрессионную активность генов могут оказывать замены или повторы нуклеотидов в регуляторных (**промоторных**) областях генов. **Наследуемые полиморфные изменения генов играют решающую роль в определении уникального биохимического профиля каждого человека, в оценке его наследственной предрасположенности к различным частым мультифакторным (мультифакториальным) заболеваниям.** Изучение медицинских аспектов ГП составляет концептуальную и методическую основу **предиктивной (предсказательной) медицины** (см. 1.2.5).

Как показали исследования последних лет, однонуклеотидные замены (SNP) и короткие tandemные моно-, ди- и тринуклеотидные повторы являются доминирующими, но отнюдь не единственными вариантами полиморфизма в геноме человека. Недавно появилось сообщение о том, что около 12% всех генов человека присутствуют более, чем в двух копиях. Следовательно, реальные различия между геномами разных людей, скорее всего, существенно превышают ранее постулируемые 0,1% [364]. Исходя из этого, в настоящее время считается, что близость неродственных геномов составляет не 99,9%, как считалось ранее, а примерно равна около 99%. Особенно удивительным оказался факт, что варьировать в геноме могут не только число копий отдельных генов, но даже целые фрагменты хромосом размерами 0,65–1,3 Мгбаз (**1 Мгб = 10^6 п. о.**). В последние годы при помощи метода сравнительной геномной гибридизации на чипах, содержащих ДНК-зонды, соот-

ветствующие всему геному человека, получены удивительные данные, доказывающие полиморфизм индивидуальных геномов по большим (5–20 Мгб) фрагментам ДНК. Данный полиморфизм получил название Copy Number Variation «варьирование числа копий», его вклад в патологию человека в настоящее время активно исследуется [316].

Согласно современным данным, количественный полиморфизм в геноме человека представлен значительно шире, чем считалось ранее; основным качественным вариантом полиморфизма являются однонуклеотидные замены — ОНЗ (SNP).

1.2.3.1. Международный проект «Гаплоидный геном» (HapMap)

Решающая роль в изучении геномного полиморфизма принадлежит международному проекту по изучению гаплоидного генома человека — «Гаплоидная карта» — HapMap.

Проект начат по инициативе Института по изучению генома человека (США) в 2002 г. Исполнителями проекта стали 200 исследователей из 6 стран (США, Великобритания, Канада, Япония, Китай, Нигерия), образовавших Научный Консорциум. **Цель проекта — получить генетическую карту следующего поколения, основу которой должно составлять распределение однонуклеотидных замен (SNP) в гаплоидном наборе всех 23 хромосом человека [521].**

Суть проекта сводится к тому, что при анализе распределения уже известных SNP (ОНЗ) у индивидов нескольких поколений соседние или близко расположенные в ДНК одной хромосомы SNP наследуются блоками. Такой блок SNP представляет собой **гаплотип — аллельный набор нескольких локусов, расположенных на одной хромосоме** (отсюда и название проекта HapMap). При этом каждый из картированных SNP выступает как самостоятельный молекулярный маркер. Для создания общегеномной карты SNPs важно, однако, чтобы между двумя соседними SNP генетическое сцепление было высокодостоверным. По сцеплению таких SNP-маркеров с исследованным признаком (болезнью, симптомом) определяются наиболее вероятные места локализации генов-кандидатов, мутации (полиморфизм) которых ассоциированы с тем или иным мультифакторным заболеванием. Обычно для картирования выбирают несколько SNP, тесно сцепленных с уже известным менделирующим признаком. Такие хорошо охарактеризованные ОНЗ с частотой редких аллелей не менее 5% получили название **маркерных SNP (tagSNP)**. Предполагается, что в

конечном счете из примерно 10 миллионов ОНЗ, присутствующих в геноме каждого человека, в процессе выполнения проекта будут отобраны только около 500 000 tagSNP. Но и этого числа вполне достаточно, чтобы перекрыть картой ОНЗ весь геном человека. Естественно, что постепенное насыщение генома такими точечными молекулярными маркерами, удобными для общегеномного анализа, открывает большие перспективы для картирования многих еще не известных генов, аллельные варианты которых ассоциированы (сцеплены) с различными тяжелыми болезнями [763].

Первый этап HapMap проекта стоимостью 138 млн долларов завершился в октябре 2005 года. Проведено генотипирование свыше миллиона ОНЗ (1 007 329) у 270 представителей 4 популяций (90 американцев европейского происхождения, 90 нигерийцев, 45 китайцев и 45 японцев). Итогом работы явилась гапloidная карта SNP, содержащая информацию о распределении и частотах маркерных SNP в изученных популяциях [521, <http://www.hapmap.org/hapmappopulations.html>].

В результате выполнения второго этапа проекта HapMap, который завершился в декабре 2006 года, та же выборка индивидов (269 человек) была прогенотипирована еще по 4 600 000 SNP. На сегодняшний день генетическая карта следующего поколения (HapMap) уже содержит информацию более чем о 5,5 млн ОНЗ. В своем окончательном варианте, который, учитывая все возрастающую скорость картирования SNP, станет доступен уже в ближайшем будущем, будет информация о 9 000 000 SNP гапloidного набора. Благодаря HapMap, которая включает не только SNP уже картированных генов с известными фенотипами, но и SNP еще не идентифицированных генов, ученые получают в руки мощный универсальный навигатор, необходимый для углубленного анализа генома каждого индивида, для быстрого и эффективного картирования генов, аллельные варианты которых предрасполагают к различным мультифакториальным заболеваниям, для проведения широкомасштабных исследований по популяционной генетике человека, фармакогенетике и индивидуальной медицине.

По словам Фрэнсиса Коллинза, директора Национального института по изучению генома человека (США): «Уже при обсуждении программы «Геном человека» 20 лет назад я мечтал о времени, когда геномный подход станет инструментом для диагностики, лечения и предупреждения тяжелых распространенных болезней, страдающие которыми больные переполняют наши больницы, клиники и кабинеты врачей. Успехи

НарМар проекта позволяют сделать серьезный шаг навстречу этой мечте уже сегодня» (<http://www.the-scientist.com/2006/2/1/46/1/>).

Действительно, с помощью техники НарМар удалось достаточно быстро картировать ген, ответственный за дистрофию сетчатки (macular degeneration), идентифицировать главный ген и несколько генных маркеров болезни сердца, определить участки хромосом и найти гены, ассоциированные с остеопорозом, бронхиальной астмой, диабетом первого и второго типов, а также с раком простаты [545, 558]. С помощью технологии НарМар можно не только вести полно-геномный скрининг, но изучать отдельные части генома (фрагменты хромосом) и даже кандидатные гены. Совмещение технологии НарМар с возможностями высокоразрешающих гибридизационных ДНК-чипов и специальной компьютерной программы сделало доступным общегеномный скрининг ассоциаций и совершило реальный переворот в предиктивной медицине в плане эффективной идентификации генов предрасположенности к различным МФЗ (см. гл. 8 и 9).

Учитывая, что генетический полиморфизм отнюдь не исчерпывается ОНЗ, а молекулярные вариации генома значительно более многообразны, ученые и издатели научного журнала Human Mutation Ричард Коттон (Австралия) и Хейг Казазьян (США) выступили с инициативой проекта **Human Variom Project**, цель которого — создание универсального банка данных, включающего в себя информацию не только по мутациям, приводящим к различным моногенным заболеваниям, но и к полиморфизму, предрасполагающему к мультифакторным болезням — <http://www.humanvariomeproject.org/index.php?p=News> [371]. Учитывая достаточную условность границ между «полиморфизмом» и «мутациями», создание такой универсальной библиотеки вариаций генома можно только приветствовать.

К сожалению, приходится констатировать, что, если в случае проекта «Геном человека» в России еще предпринимались некоторые попытки участия в совместных исследованиях, то при выполнении международного проекта НарМар отечественные ученые практически не были задействованы. Соответственно, воспользоваться технологией общегеномного скрининга SNP в России при отсутствии необходимого аппаратного и программного обеспечения, весьма проблематично. Между тем, учитывая популяционные особенности генетического полиморфизма, внедрение в России технологии GWAS совершенно необходимо (см. гл. 9).

С глубоким сожалением приходится констатировать, что уже существующий колоссальный разрыв между отечественной и передовой мировой наукой в области изучения генома человека после завершения программы НарМар будет только стремительно увеличиваться.

1.2.3.2. Новые проекты по изучению генома человека

Проект НарМар далеко не единственный, хотя и наиболее продвинутый в исследованиях структурно-функциональной организации генома человека в наше время. Другой международный проект — **ENCODE «Энциклопедия ДНК элементов»**, инициированный Национальным институтом исследования генома человека, США (НИИГЧ) (National Institute of Human Genome Research — NIHGR). Его цель — точная идентификация и картирование всех белок-синтезирующих генов и функционально значимых элементов генома человека. В качестве пилотных исследований проект предполагает многократно просеквенировать и детально изучить фрагмент генома размером до 1 % общей длины ДНК. Наиболее вероятным кандидатом является участок генома размером около 30 Мегабаз (млн п. о.) в коротком плече хромосомы 6. Именно там расположен очень сложный в структурно-функциональном отношении локус HLA, ответственный за синтез антигенов гистосовместимости. Планируется просеквенировать область HLA у 100 пациентов с аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка, диабет 1 типа, рассеянный склероз, бронхиальная астма и др.) и у 100 соматически здоровых доноров, чтобы понять молекулярную природу генных особенностей при этих патологиях. Аналогичным образом предполагается провести идентификацию генов-кандидатов в локусах, обнаруживающих неслучайную ассоциацию с частыми тяжелыми заболеваниями мультифакторной природы. Результаты проекта ENCODE частично уже опубликованы, однако, HLA локус в него не включен [<http://www.nature.com/nature/journal/v447/n7146/full/nature05874.html>].

Еще один проект — **NIHGR «Химическая геномика»** — ставит своей целью создание общедоступной библиотеки химических веществ, преимущественно органических соединений, удобных для изучения главных метаболических путей организма, непосредственно взаимодействующих с геномом и перспективных для создания новых лекарственных препаратов.

Проект **Genome to Life «Геном для жизни»** обращает основное внимание на особенности метаболизма и организацию геномов одноклеточных организмов, патогенных для человека. Предполагается, что итогом его выполнения будут компьютеризированные модели реакции микробов на внешние воздействия. Исследования будут сосредоточены на четырех основных направлениях: белки бактерий, регуляторные механизмы работы генов, микробные ассоциации (симбиоз), взаимодействие с организмом человека (www.genomestolife.org).

Наконец, главной организацией по финансированию научных проектов Великобритании Wellcome Trust создан **Консорциум по геномике трехмерной структуры белков (Structural Genomic Consortium)**. Его цель — на основе данных по изучению генома человека повысить эффективность поиска и синтеза новых лекарств направленного действия.

Непосредственное отношение к предиктивной медицине и фармакогенетике имеет и разрабатываемый в США и в странах Западной Европы проект **«Геном и окружающая среда» (Environmental Genome Project)**. Некоторые подробности данного проекта будут рассмотрены в следующей главе.

1.2.4. Этические, правовые и социальные аспекты исследования генома человека

По мере все более полного проникновения генетики не только в медицину, но и в социальные сферы жизни и нарастающей заинтересованности всех слоев мирового сообщества в достижениях генетики [360, 361], все более очевидным для ученых, чиновников, правительств и просто образованных людей становится необходимость решения многочисленных этических, юридических, правовых и социальных проблем, порождаемых внедрением успехов генетики в жизнь человека [55, 100, 105, 413]. Серии этических, правовых и социальных программ, направленных на изучение проблем адаптации человека и общества в целом к восприятию достижений генетики, быстро развиваются при финансовой поддержке тех же комитетов, институтов и организаций, которые финансируют программу «Геном человека» [361]. Эти проблемы широко обсуждаются на многочисленных конгрессах, форумах и научных конференциях по медицинской генетике [406]. Разрабатываются и специальные образовательные программы по медицинской генетике для врачей и среднего медицинского персонала.

1.2.5. Геном человека и молекулярная медицина

Одним из итогов изучения генома человека является появление и быстрое развитие качественно нового раздела медицинской науки — **молекулярной медицины** [360, 652]. Идентификация многих тысяч генов, выяснение молекулярных механизмов наследственных и мультифакториальных заболеваний (МФЗ), роли генетических факторов в этиологии и патогенезе многих инфекций, доказательство генетической уникальности каждого индивида — вот основные достижения, которые заложили научный фундамент молекулярной медицины. Нет сомнения в том, что именно ей принадлежит будущее. Молекулярная медицина — это медицина XXI века [30–32, 154] (табл. 1.1, № 10). общепризнанны достижения молекулярной медицины и ее быстро развивающихся направлений (рис. 1.1). Главные из них следующие.

- Разработаны точные, эффективные и в значительной степени универсальные методы диагностики наследственных болезней на любой стадии онтогенеза, в том числе и до рождения (**пренатальная диагностика**) [5, 56–58, 173, 167].
- Разработаны молекулярные подходы к абсолютно точной идентификации личности (**геномная дактилоскопия**) [223].
- Заложены экспериментальные и клинические основы **генной терапии** наследственных и ненаследственных болезней [40, 43, 186].
- На основе данных об индивидуальном биохимическом (генетическом) фингерпринте, то есть генетической (биохимической) уникальности каждого человека, начаты исследования по **фармакогенетике** — анализу причин особенностей низкой или, наоборот, повышенной чувствительности индивидов или отдельных популяций (этносов) к действию различных лекарственных препаратов или химических веществ [30–32, 126, 204, 366, 621] и по **фармакогеномике** — использованию данных геномики для разработки основ индивидуальной терапии и направленному созданию новых лекарств, специфически влияющих на отдельные звенья патологического процесса [252, 366, 415] (см. также в Интернете — табл. 1.1, № 4, 5).
- Активно разрабатываются молекулярные основы **профилактической (предиктивной) медицины** [30, 34, 44, 348] (табл. 1.1, № 9, 10), основу которой составляет тестирование **генов предрасположенности**.

Таким образом, **молекулярная медицина** и ее основные направления — предиктивная медицина, фармакогенетика, генная терапия — это результат широкого внедрения генетических знаний в медицинскую науку после расшифровки генома человека.

Характерной особенностью молекулярной медицины как медицины, основанной на данных о молекулярной структуре генома человека, является ее **индивидуальный** характер. Она направлена на коррекцию патологического процесса у вполне конкретного человека с учетом уникальных особенностей его генома. Ее другая важнейшая особенность — выраженная **профилактическая направленность**. Полные сведения о геноме могут быть получены задолго до начала заболевания. Соответствующие профилактические мероприятия могут полностью ликвидировать или в значительной мере предупредить развитие тяжелого заболевания. Именно молекулярная медицина и ее основные направления (предиктивная медицина, генная терапия, фармакогеномика), научный фундамент которых составляет геном человека, и будет определять все многообразие фундаментальных и прикладных наук о человеке в XXI веке, а возможно, и во всем третьем тысячелетии. Дальнейшим этапом развития молекулярной медицины, контуры которого все более отчетливо проступают уже в наши дни, является **синтетическая медицина** — продукт геномики и протеомики, анализирующих не только индивидуальные молекулярные особенности генома, но и особенности его функции в условиях меняющихся факторов внешней среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения Международной программы «Геном человека» и последующих молекулярно-генетических исследований получены новые данные о структурно-функциональной организации генома человека. Итогом программы явился ряд новых научных направлений, главные из которых функциональная геномика, сравнительная геномика, генетическое разнообразие генома человека, социально-экономическая геномика и молекулярная медицина. Установлен не только точный размер генома человека (3 164,7 млн п. о.), но и достаточно четко определено общее количество генов (около 22 000). Углубленный молекулярный анализ генома человека позволил обнаружить в последние годы еще около 6 000 ранее неизвестных транскрибируемых

последовательностей ДНК, которые напоминают гены, но, скорее всего, таковыми не являются. Решающий прорыв в области функциональной геномики был сделан благодаря открытию нового класса малых РНК, которые, по-видимому, играют важную роль в регуляции работы генов. Важными новациями в этой области являются также открытие «эпигенетического» кода и возможность изучения экспрессионного генетического профиля всех генов в разных органах, тканях и на разных стадиях развития. В ближайшем будущем быстрый прогресс в геномике следует ожидать и от завершения первых двух этапов обширной международной программы по созданию подробной карты однонуклеотидных повторов (SNP) гаплоидного генома человека (проект HapMap), разработки новой технологии Общегеномного скрининга ассоциаций, а также открытия новых типов генетического полиморфизма на уровне числа генов и даже целых, достаточно протяженных (до 20 Мгб) отрезков ДНК. Много новых гипотез, теорий и обобщающих концепций можно ожидать от сравнительной геномики. Успешное секвенирование геномов живых организмов разных отрядов, классов и видов позволяет уже сегодня проводить детальный анализ особенностей эволюции геномов, процессов филогенеза и этногенеза человека и, возможно, на каком-то этапе приведет к созданию новой «генетической» систематики животного мира. Важнейшим практическим итогом расшифровки генома человека и последующих разработок явилось появление и быстрое развитие молекулярной медицины — медицины, в которой диагностика, лечение и профилактика болезней осуществляются на уровне ДНК и продуктов ее экспрессии (РНК, белки). Две основные особенности молекулярной медицины отличают ее от медицины традиционной (классической): индивидуальный характер (геном каждого человека уникален) и ее профилактическая направленность (геном можно проанализировать задолго до начала болезни). Концептуальную и методическую основу одного из направлений молекулярной медицины — предиктивной (предсказательной) медицины — составляет тестирование аллельных вариантов генов-маркеров, позволяющее оценить состояние наследственной предрасположенности человека к тому или иному МФЗ. Широкое внедрение в практику достижений молекулярной медицины настоятельно требует безотлагательной разработки юридических, правовых и этических документов, регламентирующих процедуру тестирования генома конкретного человека и доступности полученных генетических данных.

ГЕНЫ, МУТАЦИИ, БОЛЕЗНИ

ВВЕДЕНИЕ

Одной из конечных целей программы «Геном человека» было определение числа генов. В значительной мере эта цель достигнута. Однако многие вопросы, касающиеся проблемы точной идентификации генов МФЗ, в связи с трудностями таких исследований на человеке остаются открытыми. Еще меньше известно о функциях подавляющего большинства уже найденных новых генов. Их изучение и, главное, выяснение сложных путей взаимодействия продуктов разных генов составляет задачу бурно развивающейся функциональной геномики (**протеомики**) [701] (см. главу 1). Вариации первичной структуры ДНК, обусловленные мутациями (полиморфизмом) составляют основу уникального генетического «портрета» каждого человека, определяют его особый биохимический (метаболический) профиль. Крайними выражениями наследственной изменчивости человека являются наследственные болезни [56–58]. Следствием вариаций структуры генов (полиморфизма), а также их эпигенетической изменчивости является наследственная предрасположенность каждого из нас к тем или иным распространенным хроническим заболеваниям.

С целью облегчения знакомства читателя с последующими, более специальными разделами монографии считаем целесообразным в данной главе представить некоторые сведения о генах, мутациях, генетическом полиморфизме и их фенотипических проявлениях — моногенных и мультифакториальных (мультифакторных) заболеваниях.

2.1. ЧТО ЕСТЬ ГЕН? СКОЛЬКО ГЕНОВ?

Вряд ли какое-либо другое понятие генетики вызывало такие жаркие дискуссии и столь часто подвергалось ревизии, как понятие «ген». Термин был предложен в 1909 году швейцарским ученым В. Иогансеном для определения **элементарной материальной единицы (фактора) наследственности**. В 1950-е годы после известных работ американских исследователей по генетике микробов Бидла и Татума понятием «ген» стали обозначать **фрагмент ДНК, ответственный за синтез одного белка («Один ген — один энзим»)**. В дальнейшем уточнили — **один ген — одна полипептидная цепь**. Вскоре, однако, была обнаружена **«прерывистость» гена**. Оказалось, что у всех эукариот, включая человека, в отличие от вирусов, бактерий и даже от ДНК митохондрий, гены в хромосоме (геномные гены) представляют собой чередование смысловых (**экзоны**) и бессмысленных (некодирующих) участков ДНК (**интронов**). Первичный продукт транскрипции (гетерогенная РНК), как оказалось, также включает в себя кодирующие и бессмысленные участки, то есть имеет прерывистую экзонно-интронную структуру. После транскрипции этот **первичный РНК-продукт** подвергается **сплайсингу (процессу вырезания из первичного транскрипта бессмысленных некодирующих интронных последовательностей ДНК) и сшиванию между собой смысловых фрагментов — экзонов**. Возникающий вторичный **экзонный продукт** транскрипции получил название **информационной РНК (иРНК)**. Именно он поступает из ядра в цитоплазму, где и обеспечивает синтез соответствующего белка.

Чтобы понять, как быстро усложняется понятие «ген» в наше время, существенно отметить, что для многих генов обнаружено явление альтернативного сплайсинга, когда из одного **первичного РНК-транскрипта** в разных тканях образуется не один, а несколько разных по длине вторичных иРНК-транскриптов. Соответственно, синтезированные с них белки (полипептиды) также будут различными. Таким образом, одна и та же ДНК-последовательность может кодировать не один, а несколько разных белковых продуктов. Известно, что человек и другие млекопитающие, геномы которых уже секвенированы, имеют примерно одинаковое число генов (около 20–25 тысяч), которое почти вдвое превышает таковое у плодовой мушки дрозофилы. Считается, что именно усложнение процессов сплайсинга и посттрансляционных

модификаций обеспечивает реальное число белков в организме человека почти в 10 раз большее, чем число генов, то есть около 200–250 тысяч [117, 701].

Ситуация с определением гена усугубляется еще и тем, что обнаружены гены, находящиеся внутри (в интронах) другого гена — **«ген в гене»**. Так, смысловой ген неизвестной функции найден внутри интрона 23 гена фактора VIII свертывания крови. Если добавить к этому, что ген как функциональная единица наследственности несет разные регуляторные элементы в непосредственной близости от начала транскрипции (обычно на 5' конце ДНК-цепи), внутри транскрибируемого участка ДНК или расположенные далеко вне самого гена, становится понятным, как трудно дать исчерпывающее определение гена на современном этапе. Наконец, в последние годы наряду с обычными структурными генами в геноме человека выявлено еще около 6 000 транскрибируемых локусов (см. главу 1). Являются ли они генами и какова их функция — пока неизвестно.

В настоящее время в зависимости от поставленной задачи используют несколько определений понятия «ген». Так, в классической генетике его принято определять **как картируемый на хромосоме локус, ответственный за тот или иной фенотипический признак** [109]. В молекулярной биологии ген рассматривают как **ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент ДНК, соответствующий определенной единице транскрипции** [191]. В программе «Геном человека» за ген принимали **единицу транскрипции, которая может быть транслирована в одну или несколько аминокислотных последовательностей** [425]. Это определение дано гену как **единице подсчета (counting gene)** в ходе выполнения программы. Вместе с тем, как признают многие исследователи, задача идентификации генов даже при наличии известной последовательности ДНК клетки все еще остается достаточно сложной. Проблема подсчета числа генов осложняется и тем, что наряду с работающими структурными генами в геноме присутствует и значительное число (более 19 000) так называемых псевдогенов, представляющих собой мутантные копии нормальных генов, которые, однако, не способны функционировать вследствие утраты или повреждения жизненно важных элементов [79].

Таким образом, сегодня можно только приблизительно оценить число работающих генов человека, которое варьирует от 20 000 до 25 000 и в среднем оценивается величиной в 22 000.

2.2. КАКИЕ ЕСТЬ ГЕНЫ?

Как видно из рисунка 2.1, различают, по крайней мере, три основные группы генов:

- 1) РНК-кодирующие гены;
- 2) «структурные» гены — геномные гены, кодирующие структурные белки;
- 3) митохондриальные гены.

РНК-кодирующие гены — функционально активны уже на стадии РНК-продуктов. Они либо определяют синтез РНК, необходимой для обеспечения процессов сплайсинга, синтеза рибосом и процессов трансляции, либо для синтеза молекул РНК, обладающих регуляторным действием, т. е. влияющих на функции других генов (например, короткие двух- и одноцепочечные интерферирующие РНК (см. главу 1)).

Гены, кодирующие белки, подразделяют на **гены «домашнего хозяйства»** (гены жизнеобеспечения) и **гены терминальной дифференцировки**, называемые также **генами специальных функций**. Последние кодируют белки, характерные для дифференцированной ткани и определяющие ее специфические функции. Например, гемоглобин в эритроцитах, мышечные белки, секреторные белки эндокринных и пищеварительных желез и многие другие. Наконец, сравнительно недавно выделились и быстро возрастают по численности гены особых ядерных белков, названных факторами транскрипции — ФТ

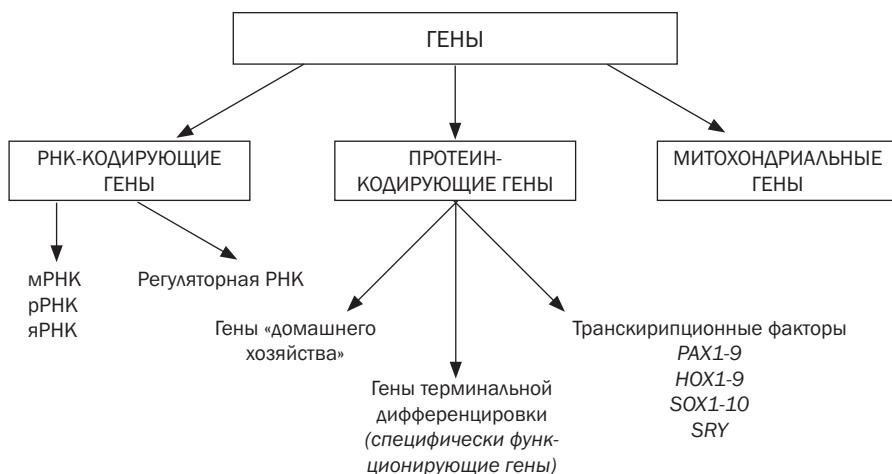


Рис. 2.1. Классификация генов

(transcription factors). Имея сравнительно небольшие размеры, эти гены характеризуются наличием высококонсервативных ДНК-последовательностей, белковые продукты которых способны соединяться с регуляторными областями ДНК многих структурных генов, вызывая их **репрессию** (подавление транскрипции) или **активацию** (начало транскрипции). Продукты генов ФТ, регулируя функциональное состояние многих структурных генов, способны контролировать целый каскад морфогенетических реакций развивающегося организма. Не случайно гены ФТ иногда называют «генами-господами», а структурные гены — «генами-рабами».

В митохондриях человека содержится всего 37 генов, отличительной особенностью которых является отсутствие интронов. 13 генов мтДНК кодируют отдельные субъединицы комплексов дыхательной цепи митохондрий и 24 обеспечивают трансляцию белка на митохондриальных рибосомах [63].

Подробнее о структуре и функциях разных генов, понятиях «ген», транскрипция, трансляция, сплайсинг можно получить в следующей литературе [67, 68, 86, 109, 121].

2.3. МУТАЦИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ

Как уже упоминалось (см. главу 1), **мутациями называют любые изменения (альтерации) в последовательностях ДНК**. Мутации могут быть функционально молчащими («нейтральными»), если они не затрагивают структуру самого гена, его регуляторных последовательностей или приводят к таким заменам нуклеотидов, при которых в конечном полипептиде сохраняется та же аминокислота. Последнее может быть результатом «вырожденности» генетического кода: каждая аминокислота кодируется несколькими разными триплетами, поэтому замена одного из трех нуклеотидов в кодоне не всегда ведет к замене аминокислоты в белке [86].

Наиболее частым вариантом спонтанных мутаций являются однонуклеотидные замены — SNP (см. главу 1), которые встречаются в ДНК примерно каждые 200–300 пар оснований. Точную локализацию определенного SNP на геномной карте можно установить путем амплификации фрагмента ДНК, содержащего сайт SNP, при помощи **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** с последующей обработкой **амплификата** специальными рестрикционными ферментами — **эндонуклеазами**.

Последние представляют собой ферменты бактериального происхождения, специфические узнающие короткие фрагменты ДНК (4–8 п. о.). В зависимости от наличия или отсутствия нужного SNP выбранная **эндонуклеаза** будет или не будет разрезать ДНК в месте локализации SNP, что можно определить на электрофореграмме [87].

Важно, однако, напомнить, что разница между мутациями и **генетическим полиморфизмом** (ГП) весьма относительна (см. главу 1). «Различия между мутациями и ГП скорее количественные, чем качественные», — утверждает известный авторитет в области популяционной генетики профессор Стэнфордского университета (США) Л. Кавалли-Сфорца (L. L. Cavalli-Sforza). Разница в том, что, в отличие от мутаций, ГП обычно встречается чаще и может присутствовать у значительной части популяции — более 1 %. Нередко, однако, даже мутации, практически полностью выключающие отдельные гены, то есть блокирующие их экспрессию, в популяции встречаются чаще, чем у 1 % населения. Так, известно, что почти половина населения белой расы не имеет одного из ферментов детоксикации ксенобиотиков — глутатион-S-трансферазы вследствие наличия протяженной делеции в гене *GSTM1* (см. главу 5). Эта мутация, равно как и мутация второго гена фазы 2 детоксикации *GSTT1* (популяционная частота «нулевых» генотипов 0/0 составляет около 20 %), рассматривается как ГП, отчасти в связи с тем, что они непосредственно не вызывают каких-либо наследственных заболеваний, хотя и ассоциированы со многими мультифакторными болезнями (см. главу 5).

Мутации, вызывающие наиболее распространенные наследственные заболевания, встречаются сравнительно редко. Их частота обычно не превышает 1 % [786]. Например, популяционные частоты мутаций, ответственных за такие генные болезни, как гемофилия А, миодистрофия Дюшенна или фенилкетонурия, значительно ниже 1 на 2–5 тысяч индивидов. Вместе с тем 10–20 % представителей белой расы Западной Европы и около 2 % жителей России являются гетерозиготными носителями мутаций гена муковисцидоза (*CFTR*) и, прежде всего, мутации delF508. На долю этой одной мутации приходится почти 60–70 % всех мутаций гена *CFTR* у больных муковисцидозом в Западной Европе [464] и 45–50 % — в России [104]. Популяционная частота гетерозиготных носителей мутации delF508 составляет около 2–5 %, что формально позволяет отнести эту тяжелую мутацию к числу ГП. Аналогично обстоит дело и со многими другими эндемичными

мутациями, например, с мутациями глобиновых генов у больных серповидно-клеточной анемией [80].

Другое, еще менее очевидное отличие мутаций от ГП относится к их влиянию на функции гена. Обычно ГП не нарушают экспрессии генов, но приводят к появлению белков с несколько измененными физико-химическими свойствами. Примером тому могут быть изоферменты, известные в настоящее время для многих белков [121]. Напротив, мутации, как правило, выключают работу гена, ведут к значительному снижению синтеза его белкового продукта («**минус эффект**») или к его избытку («**плюс эффект**»), или к появлению аномального белка, следствием чего являются те или иные моногенные болезни [58]. В отличие от ГП, фенотипический эффект большинства известных мутаций проявляется достаточно четко в виде той или иной наследственной болезни.

Важно отметить, что, по крайней мере, некоторые ГП, особенно расположенные в экзонах или в регуляторных последовательностях (промоторы, энхансеры и пр.) [191], отнюдь не являются функционально нейтральными и могут неблагоприятно сказываться на функциях белковых продуктов соответствующих полиморфных вариантов гена. В типичном случае внутригенные SNP могут приводить к изменению генетического кода и, как следствие этого, к замене в полипептидной цепочке одной аминокислоты. Как правило, новый белковый продукт такого гена выполняет свои функции хуже исходной формы (аллеля «дикого типа»), что на фоне меняющихся внешних условий может способствовать развитию различных заболеваний.

Таким образом, генетический полиморфизм и мутации суть явления одного порядка. Грань между этими понятиями весьма условная, как зачастую условно разделение понятия нормы и патологии [369].

2.4. КЛАССИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ

Подавляющее большинство мутаций является результатом замены одного нуклеотида на другой в смысловой части гена (экзоне). Эти альтерации обычно происходят во время **репликации (удвоения)** ДНК при подготовке клетки к делению. Хотя процесс репликации чрезвычайно точный и существует сложная система ферментов узнавания и исправления ошибок репликации (репарации), тем не менее, такие ошибки встречаются в среднем с частотой 10^{-9} – 10^{-11} на один включенный нуклеотид [547]. Другим важным источником точечных (нуклео-

тидных) замен является мутагенный эффект радиации или химических веществ (мутагенов). Следовательно, точечные мутации (нуклеотидные замены) могут быть результатом действия химических, физических и биохимических факторов.

Точечные замены в кодирующих последовательностях ДНК могут быть причиной различных мутаций, тип которых полностью определяется природой нуклеотидной замены, то есть тем, каким становится трехбуквенный код (**кодон**) нуклеотидной последовательности ДНК после замены. Так, в случае **нонсенс (nonsense) мутации** замена нуклеотида в кодирующей части гена приводит к образованию **стоп-кодона** — триплета, на котором прекращается трансляция и, соответственно, синтез белка на рибосомах. В случае **миссенс (missense) мутации** возникает триплет, соответствующий кодону другой аминокислоты, которая и оказывается включенной в полипептидную цепь мутантного белка. Точечная мутация с утратой или вставкой одного или двух нуклеотидов может приводить к сдвигу рамки считывания (**frameshift**) и к остановке трансляции. Наконец, точечные замены нуклеотидов на границе экзон-интронных стыков могут нарушать процесс узнавания сигнальных последовательностей ДНК соответствующими молекулами РНК (так называемые U-РНК) и быть причиной нарушения процесса **сплайсинга**. Это так называемые **сплайсинговые** мутации [191]. При этих мутациях наблюдается утрата соответствующего экзона либо, наоборот, сохранение продукта транскрипции соседнего интрона. В обоих случаях структура вторичного РНК-транскрипта и синтез кодируемого им белка оказываются нарушенными.

Следует отметить, что точечные мутации зачастую имеют не случайное расположение в геноме и даже в отдельных генах. Нередко они сосредоточены в каких-то ограниченных участках ДНК-последовательностей. Особенно часто нуклеотидные замены затрагивают области CpG-островков. Это последовательности ДНК в 200–300 п. о., расположенные в начале транскрибируемой (смысловой) части многих структурных генов (особенно генов «домашнего хозяйства») и являющиеся «**промоторами**» этих генов, то есть регуляторами их транскрипционной активности [547].

К другим типам распространенных мутаций относятся делеции (отсутствие ДНК-фрагментов разной протяженности), дупликации (удвоение фрагментов ДНК), инсерции (перемещенные фрагменты ДНК), транслокации (обмен фрагментами ДНК между разными генами или хромосомами). Часть этих мутаций (дупликации, делеции, инсерции)

может вызывать генетический дисбаланс и приводить к серьезным нарушениям синтеза белка. Тогда как другие (инверсии, транслокации) обычно не сопровождаются утратой или приобретением генетического материала и никак не проявляются в фенотипе, то есть ведут себя как типичные «нейтральные» мутации [86].

Отдельный тип мутаций представлен так называемыми «динамическими» мутациями — спонтанными изменениями числа tandemных повторов из одного и более нуклеотидов в транскрибируемой части гена. Особенно часто этот тип мутаций характеризуется нарастанием числа триплетных (а в некоторых случаях и более протяженных) повторов в кодирующих или не кодирующих частях генов. Такой тип мутаций оказался характерным для клинически полиморфной группы наследственных заболеваний, получивших название болезни «**экспансии**» [107]. В ряде случаев экспансия триплетов ведет к синтезу пептидов с необычно длинными монотонными трактами одной аминокислоты, например, глутаминовой, в случае нейродегенеративных заболеваний, таких как хорea Гентингтона, болезнь Кеннеди, болезнь Джозефа–Мачадо и спиноцереbellарных атаксий [107]. В других триплетные экспансии ведут к нарушению функции генов и к дефициту соответствующих белков (синдром ломкой X-хромосомы, миотоническая дистрофия, атаксия Фридрейха, одна из форм эпилепсии).

Разработана и постоянно совершенствуется система записи различных типов мутаций, а также полезных для диагностики ГП. Последний вариант такой номенклатуры, одобренный Международным комитетом по генетической номенклатуре, принят в 1996 году [322]. Рекомендации по унификации системы записи более сложных мутаций (дубликации, делеции, инверсии и пр.) предложены в 2000 году Т. дэн Дунненом (Нидерланды) и Ст. Антонаракисом (Швейцария).

В настоящее время происходит быстрое накопление данных о мутациях в различных генах, приводящих к наиболее частым тяжелым наследственным заболеваниям. Для получения информации об уже известных мутациях соответствующих генов и способах их детекции созданы специальные базы ДНК-данных по отдельным нозологиям. В таблице 4.3. суммированы адреса в Интернете для доступа в банки данных наиболее частых моногенных и некоторых мультифакториальных болезней.

Для большинства частых моногенных болезней точность идентификации мутации уже сегодня находится в пределах 90–100 % (муко-

висцидоз, миодистрофия Дюшенна, гемофилия, хорея Гентингтона, синдром ломкой X-хромосомы, фенилкетонурия). В то же время для большинства мультифакториальных заболеваний с выраженным генетическим компонентом эффективность детекции мутаций (полиморфизма) в соответствующих генах предрасположенности колеблется в широких пределах (от 10 до 90 %), составляя в среднем около 40 % [786]. Информацию о мутациях генов, ответственных за наследственные заболевания человека, можно получить через систему Интернет из Европейского института биоинформатики (EBI) в Швеции, включающую информацию из 40 баз данных (<http://srs6.ebi.ac.uk>).

2.5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ

Согласно классическому определению, генетический груз понимают как **«часть наследственной изменчивости популяции, определяющую появление менее приспособленных особей, подпадающих под избирательное действие естественного отбора»** [17]. По образному выражению известного английского генетика Д. Холдейна, «генетический груз — это цена, которую вынуждена платить популяция за право эволюционировать». Естественно, что груз включает как уже циркулирующие в популяции мутации, передающиеся из поколения в поколение, так и новые мутации в гаметах или клетках зародышей. По некоторым оценкам [58], величина генетического груза в европейских популяциях и в России составляет около 5,5 %, из которых примерно 1 % приходится на **моногенные болезни** (мутации одного гена); 0,5 % связаны с хромосомными aberrациями и 3–4 % составляют **мультифакториальные болезни** с выраженным генетическим компонентом.

Важно подчеркнуть, что паттерн (спектр) и частоты различных мутаций, равно как и полиморфизма, обладают выраженной популяционной специфичностью. Это означает, что ГП и мутации, характерные для населения одного региона или этноса, существенно отличаются от таковых в других географических ареалах или в других этнических группах. Экологическая адаптация, различия в продуктах питания, тяжелые инфекции (оспа, чума, холера, СПИД), селективное преимущество гетерозигот (эффект гетерозиса), эффект основателя (особенно в замкнутой популяции), дрейф генов (случайные колебания в популяции числа аллелей) — вот основные популяционные факторы и механизмы, определяющие естественные колебания числа ГП и мутаций в различ-

ных популяциях и в регионах мира [75]. Классическим примером вышесказанного может быть серповидноклеточная анемия, обусловленная мутациями бета-глобинового гена. Заболевание распространено в бассейне Средиземного моря, но редко встречается в других частях света. Определенные селективные преимущества в отношении холеры имеют гетерозиготы по «тяжелой» мутации гена *CFTR* delF508, которая у гомозигот приводит к смертельному заболеванию — муковисцидозу [104].

Уместно также упомянуть о существовании генных болезней, характерных преимущественно для какой-то определенной этнической группы или достаточно замкнутой популяции, например, о типичных «еврейских болезнях» (болезнь Леш–Нихана, Вильсона–Коновалова), «финских болезнях» (аспартилглюкозаминурия). Анализ распространенности генных болезней в разных популяциях и в разных регионах дал начало новому направлению — **генеогеографии** — науке, изучающей методами популяционной генетики географию распространенности различных генетических маркеров, в том числе и наследственных болезней [75, 80].

2.6. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ

Число известных наследственных болезней и синдромов в настоящее время оценивается в 4500 (OMIM, 2007). Предполагается, что расшифровка генома и идентификация новых генов не сильно отразятся на этой величине, хотя и приведут к уточнению генов-кандидатов, ответственных за конкретные наследственные заболевания, а также генов-модификаторов, наличие которых в том или ином аллельном варианте может существенно влиять на фенотипические особенности болезни. К 2003 году были идентифицированы и исследованы на наличие мутаций гены 1485 наследственных болезней человека [620]. Гены еще примерно 3000 наследственных заболеваний, а также болезней с выраженным наследственным компонентом в дальнейшем также будут определены.

Наследственные болезни (НБ), обусловленные мутациями в одном гене, получили название **моногенных НБ**. Несмотря на свою многочисленность (3000–4000), их вклад в общую заболеваемость и смертность достаточно скромный и составляет всего около 1% [58, 80]. При этом почти половина приходится на наиболее частые моногенные НБ,

такие как муковисцидоз, гемофилия А, миодистрофия Дюшенна, синдром ломкой Х-хромосомы, фенилкетонурия [146].

Значительно более распространенными являются НБ, где вовлечены не один, а несколько генов. Так, по крайней мере два гена (*BRCA1*, *BRCA2*) могут определять развитие наследственных форм рака молочной железы, три гена (*PS1*, *PS2*, *AAP*) — развитие семейных форм болезни Альцгеймера, более 10 генов подозревается в развитии диабета, шизофрении, маниакально-депрессивного психоза, атеросклероза, то есть так называемых **полигенных НБ**. Важно отметить, что проявление мутаций этих генов всегда зависит и от наличия провоцирующих внешних факторов. Отсюда эту наиболее важную в медицинском отношении группу обычно называют **мультифакториальными (мультифакторными) НБ**. Ожирение, остеопороз, эндометриоз, инфаркт миокарда, большинство опухолей, психических и сердечно-сосудистых заболеваний как раз и относятся к этой категории, так как они являются следствием взаимодействия многих генов с неблагоприятными факторами внешней среды [58].

Особенности корреляции генетических факторов с различными типами заболеваний представлены на рисунке 2.2. В наиболее простом варианте мутация в единичном гене, обычно в одном из генов терминальной дифференцировки (гемоглобин, дистрофин, факторы свертываемости крови и другие) с высокой степенью вероятности, близкой к 100 %, вызывает то или иное заболевание (1). При слабых мутациях в этих генах либо в генах болезней с поздней манифестацией (см. главу 5.5) значительно усиливается вклад генов-модификаторов и внешних факторов. Заболевают не все носители этих мутантных генов, а только те из них, у кого эти сочетания наименее благоприятны. Генетическое тестирование в семьях высокого риска заболеваний с поздней манифестацией («болезни взрослых»), к которым относятся аденоматозный полипозный рак толстого кишечника, семейный рак молочной железы и яичников, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, в настоящее время рассматривают как одно из направлений молекулярной медицины — «**превентивной медицины**» [328] (2). Наконец, возникновение большинства мультифакториальных заболеваний определяется мутациями или ГП не в одном, а сразу во многих генах, которые реализуются только при наличии соответствующих неблагоприятных средовых факторов. Тестирование аллельных маркеров и возможная фенотипическая коррективировка их функций могут существенно уменьшить число лиц, у

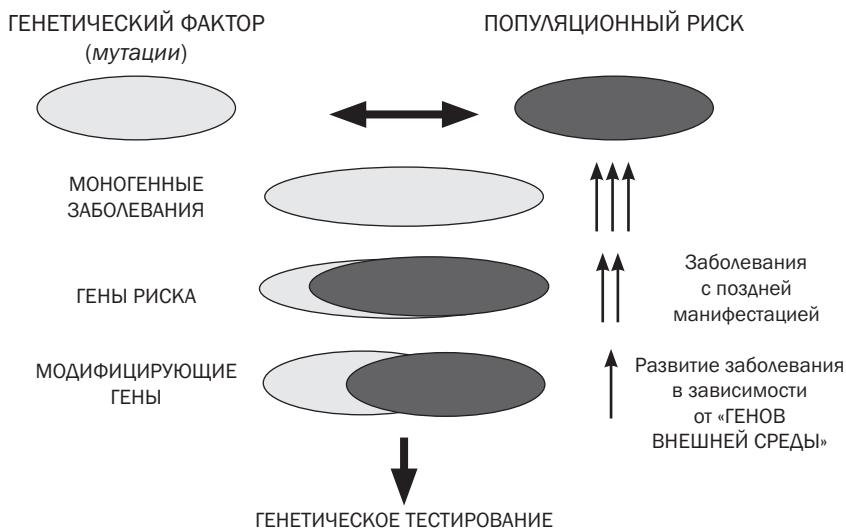


Рис. 2.2. Роль генетических факторов в генезе различных заболеваний

которых реально разовьется мультифакторное заболевание (атеросклероз, диабет, инфаркт миокарда, гипертония и прочие (3). Досимптоматическое выявление индивидов групп высокого риска по мультифакториальной патологии и ее первичная профилактика являются основными задачами **предиктивной (предсказательной) медицины** [30].

Вместе с тем молекулярные исследования последних лет, касающиеся проблемы фенотипической и генетической гетерогенности наследственных заболеваний, свидетельствуют о достаточной условности такой «генетической» классификации болезней человека. Некоторые выдающиеся молекулярные биологи, например, канадский ученый Лап-Чи Тсуи — первооткрыватель гена муковисцидоза, считают устаревшим даже понятие «моногенные болезни», поскольку клинические проявления даже идентичной мутации одного и того же гена (например, *delF508* гена *CFTR* при муковисцидозе) в значительной мере определяются индивидуальными особенностями многочисленных генов-модификаторов, влияющих на фенотипическое проявление мутантного гена. Кроме того, как недавно установлено, многие распространенные болезни в зависимости от типа наследования (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, диабет и другие) могут иметь как моногенную, так полигенную и даже мультифакториальную этиологию. Принимая во внимание, что все заболевания человека, в том числе и индуциро-

ванные неблагоприятными экзогенными факторами (физическими, химическими, биологическими), всегда проецируются и реализуются на вполне конкретном индивидуальном геноме, все болезни человека можно в той или иной мере рассматривать как наследственные. Важно, однако, отметить, что передаются по наследству только моногенные и некоторые полигенные заболевания. В случае мультифакториальной патологии наследуются только функционально ослабленные аллели, неблагоприятные сочетания которых могут провоцировать развитие того или иного хронического заболевания или определять повышенную чувствительность человека к действию различных повреждающих факторов внешней среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По мере углубления наших знаний о структуре генома, расшифровки его первичной нуклеотидной последовательности понятие «ген» также претерпевает определенную эволюцию.

Понятие «ген» в классической генетике несколько отличается от такового в молекулярной биологии, где его рассматривают как ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент ДНК, соответствующий определенной единице транскрипции. Согласно последним данным, общее число генов у человека оценивают величиной 20–25 тысяч. Различают три основных типа генов: РНК-кодирующие гены, геномные гены, кодирующие структурные белки («структурные» гены), митохондриальные гены. Структурные гены подразделяются на гены «домашнего хозяйства», обеспечивающие процессы жизнедеятельности клетки, и гены терминальной дифференцировки. Выделена особая группа генов — факторы транскрипции, белковые продукты которых выполняют функции главных регуляторов процессов морфогенеза и дифференцировки. Любые изменения первичной структуры ДНК являются мутациями. ГП в строгом смысле слова также является мутацией. Однако ГП обычно встречается в популяции с частотой более 1 % и сам по себе не приводит к типичным моногенным болезням. Качественные и количественные границы между понятиями ГП и мутации весьма условные. Дана классификация основных типов мутаций, включающая и новый тип — «динамические» мутации. Последние обусловлены увеличением числа микросателлитных, особенно триплетных, повторов

в транскрибируемой и в нетранскрибируемой последовательностях гена. Дано определение генетического груза, величина которого в Европейской части РФ, по некоторым данным, составляет 5,5 %. При этом на долю наследственных моногенных и хромосомных болезней приходится только около 1,5 %. Характерным для многих моногенных болезней является выраженный популяционный полиморфизм, проявляющийся в существенных колебаниях их частот в различных странах и географических регионах. В зависимости от этиологических факторов все наследственные болезни достаточно условно подразделяются на моногенные и мультифакториальные. Тяжесть заболевания, время манифестации и клиника наследственных болезней зависит от природы мутаций, повреждающих работу гена, генов-модификаторов, влияющих на проявление патологических признаков, и факторов внешней среды. На долю типичных моногенных болезней приходится только около 1 % всей патологии человека. За исключением достаточно редких семейных моногенных и полигенных форм, все остальные заболевания человека, в том числе самые распространенные (сердечно-сосудистые, онкологические, психические, нейродегенеративные и другие) относятся к мультифакториальным/мультифакторным болезням, в этиологии которых основная роль принадлежит наследственной предрасположенности и неблагоприятным факторам внешней среды. Молекулярное тестирование генов при болезнях с поздней манифестацией («болезни взрослых») составляет методическую основу превентивной медицины. Анализ паттернов аллельного полиморфизма генов частых мультифакториальных болезней лежит в основе предиктивной (предсказательной) медицины.

ГЕННЫЕ СЕТИ И ГЕНЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

ВВЕДЕНИЕ

Согласно известному постулату классической (формальной) генетики, «любой фенотипический признак является результатом экспрессии всех генов, даже если их влияние исчезающе мало». Соответственно, справедливо и обратное утверждение: «каждый ген влияет на любой признак организма, даже если его фенотипический эффект исчезающе мал» [131]. Признавая справедливость этого положения в концептуально-философском плане, нельзя не отметить его неконструктивность в практическом отношении. Действительно, как отмечалось ранее (см. главу 2), для медицинской генетики особый интерес представляет информация о корреляции той или иной патологии с мутациями одного гена (моногенные болезни), разных генов (полигенные болезни) или установление ассоциации болезни с аллельными вариантами определенных генов (мультифакторные болезни). Расшифровка генома человека, успехи функциональной геномики и ее дочерних направлений (протеомики, транскриптомики, метаболомики) позволили существенно расширить наши представления о работе всего генома и составляющих его генов на разных стадиях онтогенеза в норме и патологии. На наших глазах возникает новая наука — **интегративная генетика**, цель которой обобщить весь накопленный объем знаний о работе генома и наметить дальнейшие перспективные пути развития геномики в XXI веке (см. главу 1). Естественно, что для осмысления такого невероятно большого по объему фактического материала необходим новый системный подход с обязательным привле-

чением новых технологий и методов анализа. Всем этим требованиям соответствует новое направление геномики — **постгеномная информатика, основанная на компьютерных базах данных структурно-функциональной организации генома человека**. Ее основу составляют современные информационно-компьютерные технологии и эффективные математические методы анализа [110].

3.1. ГЕННЫЕ СЕТИ

Важное значение в постгеномной информатике принадлежит понятию «**генная сеть**». Согласно определению ведущего исследователя в данной области профессора Н. А. Колчанова (Новосибирск), **генная сеть — это группа координированно функционирующих генов, обеспечивающая формирование фенотипических признаков организма (молекулярных, биохимических, физиологических)** [77, 110].

Разработаны и стремительно совершенствуются методы реконструкции генных сетей различных функционально важных метаболических систем организма. На основе аннотации многочисленных, как правило, сильно разрозненных, экспериментальных данных, полученных методами структурной и функциональной геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, разработана специальная технология реконструкции генных сетей человека, животных, растений. С ее помощью создана база данных GenNet (<http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenetworks.shtml>). В ней содержатся описания 37 генных сетей, ответственных за различные жизненно важные функции организма человека, а также информация о метаболических и регуляторных сигналах, контролирующих, интегрирующих и направляющих работу этих генных сетей.

Все процессы в организме — результат взаимодействия (интеграции) его генных сетей. Будучи дискретными и функционально автономными сообществами генов и продуктов их экспрессии, **локальные генные сети** интегрированы в одну **глобальную сеть организма**. Таким образом, в понятии биоинформатики каждый человек — это глобальная сеть из множества локальных генных сетей — «**сеть сетей**».

Подробно изучены механизмы взаимодействия и интеграции генных сетей, обеспечивающих регуляцию уровня глюкозы в организме, синтез стероидных гормонов, функции адипоцитов (клеток жировой ткани) [110], механизмы эритропоэза [77], генные сети окислительного стресса, вызываемого активными формами кислорода (РЕДОКС-регуляция) [199,

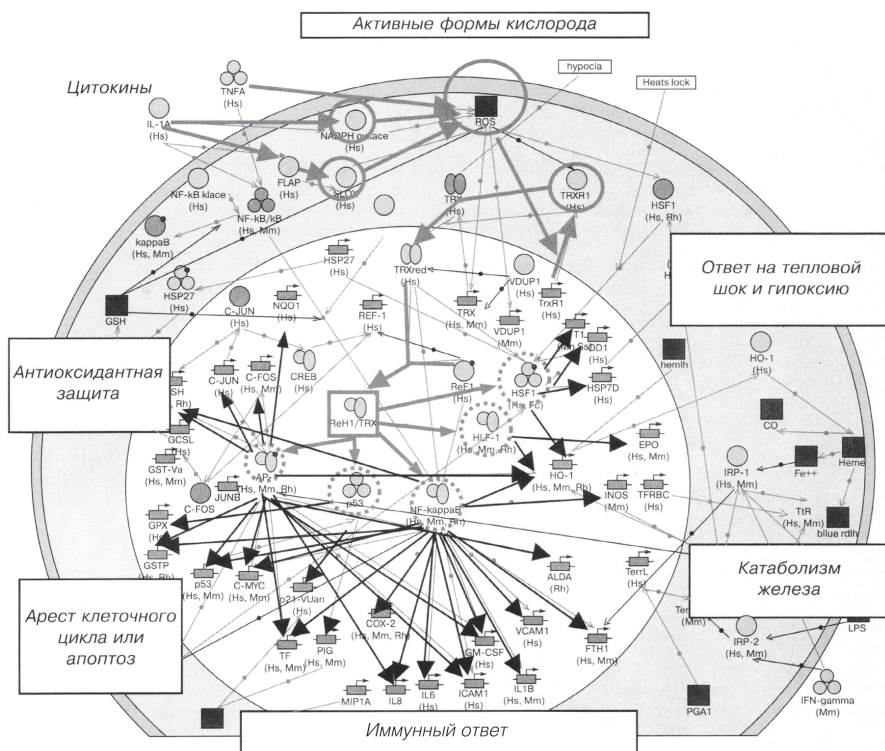


Рис. 3.1. Генная сеть редокс-регуляции, обеспечивающая адаптацию организма к окислительному стрессу, объединяет через ключевые транскрипционные факторы локальные генные сети по Степаненко [199]

110]. Детальная информация о генных сетях и редокс-генах, экспрессия которых зависит от окислительно-восстановительных потенциалов клетки, имеется на сайте <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/papers/stepanenkov/rostr-trd>. Принципиальная схема генной сети редокс-регуляции, обеспечивающая адаптацию организма к окислительному стрессу, представлена на рисунке 3.1. Через систему ключевых транскрипционных факторов (гены-господа, гены-регуляторы — см. главу 2) она объединяет 6 локальных генных сетей, включающих сеть антиоксидантной защиты (1), регуляции клеточного цикла (2), иммунного ответа (3), катаболизма железа — активации генов эритропоэза (4), реакции на тепловой шок и гипоксию (5), апоптоза и ареста клеточного цикла (6). Общая редокс-регуляция осуществляется редокс-белками, главные из которых — тиреоредоксин (TRX) и редокс-фактор (Ref-1) [199].



Рис. 3.2. Иерархия локальных генных сетей, контролирующих отдельные функции, в единой генной сети организма по Колчанову, Новосибирск [77, 110]

Интеграция различных локальных генных сетей в организме может быть **горизонтальной и вертикальной (иерархической)**. Иерархия локальных генных сетей, контролирующих отдельные функции единой генной сети организма приведена на рисунке 3.2.

Генные сети каждого уровня взаимодействуют между собой и регулируют работу сетей других уровней. При этом в качестве интеграторов выступают нейрогуморальные и метаболические сигналы, а также особые **генные сети — интеграторы**. **Горизонтальная интеграция** — это интеграция генных сетей одного уровня. Например, паракринный вариант интеграции инсулиновой и глюкокаоновых генных сетей, регулирующих уровень глюкозы в крови. Примером **вертикальной интеграции** может служить генная сеть регуляции синтеза стероидных гормонов, которая имеет три уровня иерархии: гипоталамус, гипофиз и периферические эндокринные железы. Важно отметить, что контроль нормального стероидогенеза клеточных структур всех трех уровней осуществляется с помощью

одного и того же транскрипционного фактора — SF1 (steroidogenic factor 1) [110].

В постгеномной информатике различают **два основных типа интеграторов генных сетей**. В первом варианте таким интегратором может быть сама генная сеть. Например, генная сеть регуляции циркадного ритма, воспринимая соответствующие внешние сигналы, задает ритм работы огромного числа генных сетей: от регуляции метаболических процессов до клеточных циклов. В качестве другого механизма интеграции генных сетей могут выступать различные **метаболиты** (глюкоза, формы активного кислорода и пр.) и **нейрогуморальные сигналы** (гормоны, транскрипционные факторы (SF1)). Следовательно, интеграция генных сетей является важнейшим фактором, определяющим адаптивный ответ всего организма и систем его жизнеобеспечения на внешние воздействия.

3.2. ГЕННЫЕ СЕТИ И БОЛЕЗНИ

Качество работы локальных генных сетей, равно как и приспособительные возможности всего организма к постоянно изменяющимся условиям внешней среды, будут зависеть от уникальных особенностей составляющих их генов. Не случайно современная генетика — это еще и **генетика взаимодействий** [44]. При этом имеются в виду взаимодействия генов внутри локальных сетей (**ген-генные взаимодействия**), между генными сетями (**интегральные взаимодействия**), а также между генными сетями и факторами внешней среды (**адаптивные взаимодействия**).

Все живые организмы — открытые системы. Они постоянно контактируют с внешней средой и, по сути, являются результатом взаимодействия их геномов с внешним миром. Каждый поступающий в организм сигнал вызывает ответную реакцию той или иной генной сети, которая с помощью соответствующих интеграторов передает сигнал другим генным сетям. Поломки в генных сетях, вызванные мутациями генов, или их функциональная неполноценность, обусловленная аллельными вариантами, может полностью разрушить или существенно исказить работу всей интегральной генной сети, то есть всего организма.

В патогенез каждого заболевания вовлекаются много разных функционально взаимосвязанных генов той или иной локальной генной сети. Наряду с главными генами, провоцирующими начало болезни, всегда

присутствуют другие, второстепенные, в том числе многочисленные гены-модификаторы, фенотипические эффекты которых во многом определяются средовыми факторами. Идентификация таких генов, выяснение характера функциональных поломок на уровне локальных и интегральных генных сетей, особенностей ген-генных взаимодействий при моногенных и особенно при частых мультифакториальных заболеваниях — важная практическая задача постгеномной информатики. Нет сомнения в том, что уже в недалеком будущем, используя методы и технологии биоинформатики, для каждого заболевания удастся реконструировать «генные сети», подобные таковым при физиологически нормальных процессах, происходящих в организме (см. 3.1).

Нет сомнения, что с помощью биоинформатики мы все глубже проникаем в тайны работающего генома, все больше узнаем о молекулярных механизмах болезней человека. Очевидно, что уже в скором будущем устоявшиеся представления о болезнях должны быть существенно пересмотрены и дополнены с учетом достижений функциональной геномики, биоинформатики и молекулярной медицины [77, 110, 154].

3.3. ГЕНЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

Гены, образующие структурный остов каждой генной сети, полиморфны, в силу чего их аллельные варианты функционально различны. Это означает, что и генные сети каждого человека функционируют по-разному. Благодаря генетическому полиморфизму каждый человек имеет свой индивидуальный биохимический отпечаток, свою норму функциональных биохимических реакций, свои адаптационные возможности в условиях действия повреждающих факторов внешней среды. Генетическим разнообразием определяется и тот давно известный факт, что все люди существенно отличаются друг от друга индивидуальными реакциями на внешние агенты, инфекции, пищевые продукты, на действие токсинов и лекарственных препаратов. Примеры межиндивидуальных различий весьма многочисленны и включают врожденную непереносимость лактозы (неспособность усваивать свежее молоко), повышенную чувствительность к соланину — гликозиду в клубнях зеленого картофеля, ингибирующему фермент псевдохолинэстеразу. Удивляют этнические различия чувствительности к алкоголю, обусловленные высоким (до 50%) уровнем мутаций в генах алкоголь- и альдегиддегидрогеназ у лиц желтой расы. Врачам хорошо известны семьи,

предрасположенные к атеросклерозу, диабету, заболеваниям сердца, легких, почек, психическим отклонениям, с высокой склонностью к онкологическим и аллергическим заболеваниям (см. гл. 1, 5, 7). Индивидуальная непереносимость лекарственных препаратов, различная чувствительность к токсинам и повреждающим факторам внешней среды также имеют в своей основе уникальные генетические особенности каждого человека, определяющие наследственную основу биохимической индивидуальности, его неповторимый наследственный отпечаток — **фингерпринт** [621]. Мы все отличаемся друг от друга не только внешне, но и по своим внутренним биохимическим, физиологическим и психологическим характеристикам, составляющим **фенотип** каждого человека, являющийся отражением индивидуальных особенностей его **генотипа**, реализованным в составе локальных и интегральных генных сетей при определенных условиях среды.

Уместно напомнить, что генетический полиморфизм далеко не всегда является нейтральным и зачастую приводит к появлению белковых продуктов с измененными физико-химическими свойствами и, соответственно, параметрами функциональной активности. Именно генетический полиморфизм является молекулярной основой открытых еще в 1958 году К. Маркертом и Н. Меллером изоферментов (изоэнзимов, изозимов), представляющих собой продукты аллельных вариантов одного и того же гена. Известно, что однонуклеотидные замены (SNP) в смысловых частях гена часто влияют на такие характеристики, как изменение третичной структуры белка, стабильность его связывания с субстратом и промежуточными метаболитами, посттрансляционную модификацию, аллостерическое регулирование, температурный оптимум активности и прочее. Некоторые миссенс-мутации оказывают сильное влияние на гидрофобность белка, его водородные, электростатические и сульфгидрильные связи. При этом функциональный спектр таких белков может сильно меняться от практически нейтрального эффекта генетического полиморфизма до полного нарушения функции соответствующего белкового продукта [800].

Особенности спектров генетического полиморфизма в зависимости от географических условий, диеты, расовой (этнической) принадлежности указывают на действие естественного отбора. В определенных условиях некоторый генетический полиморфизм может предрасполагать либо, наоборот, препятствовать проявлению различных заболеваний. Гены, аллельные варианты которых при наличии неких условий

предрасполагают к определенным заболеваниям, и получили название **генов предрасположенности** [622]. Таким образом, **гены предрасположенности** — это мутантные гены (аллели), которые совместимы с рождением и жизнью в постнатальном периоде, но при определенных неблагоприятных условиях способствуют развитию того или иного заболевания [39].

На ранних этапах наших исследований (1995–2000) в зависимости от особенностей действия и роли в метаболических процессах условно выделены три группы генов предрасположенности: **гены «внешней среды»**, **гены — «триггеры» (метаболические шунты)** и **гены клеточных рецепторов** [30–32]. В дальнейшем мы добавили к этим группам другие, в частности, **гены иммунной защиты**, **гены «старения»**, многочисленные **гены предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям** [39]. Неблагоприятные сочетания аллельных вариантов в одной или в нескольких генных сетях лежат в основе таких болезней, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, остеопороз, диабет, бронхиальная астма, опухоли, различные виды акушерской и гинекологической патологии. Подробное описание генных сетей каждого из перечисленных заболеваний, аллельных вариантов соответствующих генов предрасположенности, диагностическое и прогностическое значение их упреждающего генетического тестирования подробно рассмотрены в последующих главах монографии.

В настоящее время в клинической практике для диагностики наследственных болезней уже применяется около 1000 генетических тестов и около 300 проходят доклинические испытания [328]. Активно разрабатываются и уже находят практическое применение панели генетических тестов для многих частых мультифакторных болезней. Идентификация всех генов человека, открытие новых генных сетей, обеспечивающих важные метаболические пути организма, неизмеримо увеличивают возможности генетического тестирования наследственной предрасположенности и повышают значение медико-генетического консультирования.

3.4. СТРАТЕГИЯ ПОИСКА ГЕНОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

Постгеномная информатика достигла серьезных успехов в реконструкции генных сетей и изучении их интеграции при многих нормально протекающих метаболических процессах. К сожалению, скудность

информации о генах, ассоциированных даже с частыми МФЗ, существенно затрудняет и делает невозможным полную реконструкцию соответствующих генных сетей.

В наших исследованиях и в работах других авторов стратегия поиска генов предрасположенности строилась по следующему плану.

1. **Выбор наиболее вероятных генов-кандидатов** на основании уже имеющихся данных по этиологии и патогенезу конкретного заболевания, основным метаболическим, биохимическим и функциональным нарушениям, вызванным патологическим процессом.
2. **Подбор функционально значимых аллелей соответствующих генов** на основании анализа литературы и данных Интернета.
3. **Популяционный анализ частот аллелей и генотипов** соответствующих генов.
4. **Сравнительный анализ аллельных частот и распределения генотипов** соответствующих генов у больных с клинически верифицированным диагнозом болезни и у здоровых лиц той же популяции, подобранных по типу «случай–контроль».

Исследования должны проводиться на репрезентативных выборках пациентов и доноров (не менее 100 человек в каждой группе).

Естественно, что такой путь, будучи весьма длительным, трудоемким и дорогостоящим, в то же время не гарантирует, что выявленные аллельные различия являются главными в цепи патогенетических механизмов данного заболевания. Они никак не исключают, что какие-то важные гены и полиморфизм той же или даже, скорее, другой генной сети, задействованной при болезни, были пропущены. Они не позволяют исключить и того, что клинически разные формы исследуемой болезни могут иметь разный паттерн генов-кандидатов.

Картирование и идентификация генов-кандидатов проводятся либо на семьях высокого риска, имеющих больного, либо на группе неродственных пациентов с данной патологией [366]. Исследование включает несколько этапов.

1. Выявление локусов хромосом, обнаруживающих неслучайное сцепление с болезнью.
2. Картирование с помощью SNP вне- или внутригенных участков, наиболее тесно сцепленных с заболеванием.
3. Идентификация гена-кандидата с помощью компьютерной базы данных или методами молекулярного (физического) картирования («прогулка», «прыжки» по хромосоме) [86].

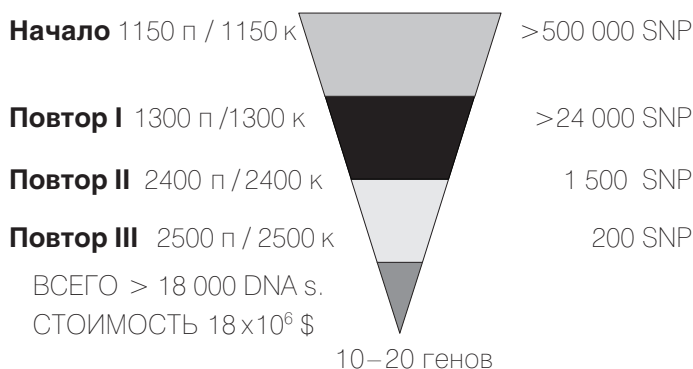


Рис. 3.3. Поиск генов предрасположенности к раку простаты путем скрининга целого генома (п — пациенты; к — контроль)

4. Сравнительный анализ аллельных частот и генотипов по соответствующим генам в популяции и у пациентов с данным заболеванием.

Предполагается, что в течение ближайших лет с помощью NapMap технологии удастся идентифицировать и оценить вклад отдельных генов и даже целых генных сетей в генез всех частых МФЗ. Это уже сделано в отношении диабета, остеопороза, некоторых форм рака, болезней глаз и других (см. главу 1). Так, в крупномасштабных исследованиях по поиску генов предрасположенности к раку простаты были исследованы образцы ДНК 1150 пациентов и 1150 доноров группы контроля (рис. 3.3). Начав с анализа сцепления 500 000 SNP, в течение трех последовательных этапов ареал геномного поиска был сокращен до 200 SNP, а в итоге были идентифицированы 15 генов-кандидатов, изучение которых продолжается (www.labo.lu). Кстати, общая стоимость всей работы составила 18 млн долларов!

Еще более эффективным на современном этапе является метод общегеномного скрининга ассоциаций (Genome Wide Association Studies — GWAS), основанный на использовании программы NapMap в сочетании с техникой биочипов высокого разрешения (см. главу 4). Метод позволяет одновременно выявлять все SNP, достоверно сцепленные с тем или иным заболеванием. Зная точное положение каждого SNP на физической карте генома, можно не только идентифицировать ген-кандидат, но и определить все аллельные варианты, ассоциированные с болезнью (см. гл. 8, 9). Анализ работ по генетическому тестированию убеждает в том, что технология GWAS уверенно становится основной для поиска генов-кандидатов при всех МФЗ.

К сожалению, эта революционная технология, насколько нам известно, пока недоступна в России. Однако, учитывая существенные популяционные различия генетического полиморфизма, внедрение технологии общегеномного скрининга ассоциаций с целью идентификации генов-кандидатов МФЗ в нашей стране представляется настоятельно необходимым. В последующих главах мы будем неоднократно возвращаться к этой проблеме.

Таким образом, широкое внедрение высокоразрешающей системы НарМар открывает большие перспективы для картирования генов-кандидатов мультифакториальной патологии и позволяет надеяться на быстрый прогресс биоинформатики и в этой области молекулярной медицины.

При получении высокодостоверных результатов ($p < 0,0005$), доказывающих наличие четкой ассоциации нозологии с тем или иным аллелем или аллельными сочетаниями, дальнейшие этапы практического внедрения генетического тестирования следующие.

1. Досимптоматическое (упреждающее) генетическое тестирование в семьях высокого риска.
2. Проспективное генетическое тестирование с обязательным последующим мониторингом состояния лиц групп высокого риска по результатам тестирования.
3. Рандомизированное предиктивное тестирование.

Последнее широко проводится только в отношении наследственных болезней с поздней манифестацией (хорея Гентингтона, семейный (наследственный) рак молочной железы и яичника, рак толстого кишечника, семейные формы болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера [319, 451, 784].

Вероятностный характер установленных аллельных ассоциаций с той или иной мультифакториальной патологией, слабая и нередко плохая воспроизводимость результатов в разных лабораториях и, тем более, в разных популяциях и на разных выборках больных создают серьезные трудности на пути широкого внедрения в практику генетического тестирования наследственной предрасположенности к распространенным тяжелым заболеваниям. Этому могли бы способствовать проспективные генетические исследования, в которых результаты оценивались бы уже *post factum*, то есть в течение длительного периода после тестирования. К сожалению, объективные трудности организации, сложности оценки отдаленных результатов

существенно затрудняют их проведение. Поэтому солидные перспективные исследования результатов генетического тестирования пока отсутствуют. Однако такие работы в настоящее время проводятся в отношении больных с сердечно-сосудистой патологией [169], а также с бронхиальной астмой (см. главу 6.1). Реальное состояние, ограничения и возможные источники ошибок при тестировании наследственной предрасположенности будут рассмотрены в последующих главах данной монографии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Один из основных выводов, который был сделан в результате выполнения программы «Геном человека», заключается в том, что гены работают не поодиночке, а включены в сложную сеть взаимодействий, функционирующую в клетке. Понятие **«генная сеть» как группа координированно функционирующих генов, обеспечивающая формирование фенотипических признаков организма (молекулярных, биохимических, физиологических)**, заняло центральное место в новом направлении геномики — **постгеномной информатике**. Основу последней составляют современные информационно-компьютерные технологии и эффективные методы математического анализа. С их помощью уже реконструированы десятки генных сетей, обеспечивающих важнейшие функциональные и морфогенетические процессы организма. Все локальные генные сети взаимосвязаны между собой в единую интегральную генную сеть всего организма. Эффективность работы генных сетей — интегральный результат функции отдельных генов, составляющих структуру этих сетей, а также факторов интеграции (метаболиты, нейрогуморальные сигналы), объединяющих локальные генные сети в единое целое. Таким образом, **современная генетика (геномика) — это генетика взаимодействия генов внутри локальных сетей (ген — генные взаимодействия), между генными сетями (интегральные взаимодействия), а также между генными сетями и факторами внешней среды (адаптивные взаимодействия)**. Гены, образующие структурный остов каждой генной сети, полиморфны, а их аллельные варианты функционально различны. Именно в силу этого обстоятельства каждый человек генетически уникален и имеет свои, характерные только для него особенности метаболизма, то есть обладает уникальным биохимическим фингерпринтом. Поломки генных

сетей, вызванные мутациями генов или функциональной неполноценностью их аллелей, могут полностью разрушить или существенно исказить работу интегральной генной сети, то есть всего организма. **Гены предрасположенности — это мутантные гены (аллели), которые совместимы с рождением и жизнью в постнатальном периоде, но при определенных неблагоприятных условиях способствуют развитию того или иного заболевания.** Идентификация генов предрасположенности к различным тяжелым хроническим заболеваниям, выяснение характера функциональных поломок на уровне локальных и интегральных генных сетей, особенностей ген-генных взаимодействий при моногенных и особенно при частых МФЗ — важная практическая задача молекулярной медицины. Используя методы и технологии биоинформатики, для каждого заболевания уже в обозримом будущем удастся реконструировать «генные сети» и понять молекулярные механизмы патологии. При этом устоявшиеся представления о болезнях будут существенно пересмотрены и дополнены в свете достижений функциональной геномики, биоинформатики и молекулярной медицины. Рассмотрены современные подходы к идентификации генов предрасположенности, этапы практического внедрения результатов предиктивного тестирования генетических полиморфных маркеров МФЗ. Отмечается, что разработанная в последние годы **технология общегеномного скрининга ассоциаций (GWAS) в значительной степени решила проблему поиска и идентификации генов предрасположенности к МФЗ.**

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА

ВВЕДЕНИЕ

Как уже отмечалось (см. главу 2), полиморфизм и мутации — явления одного порядка, суть которого составляют изменения структуры ДНК. Естественно, что и методы, применяемые для идентификации аллельных вариантов, то есть для изучения полиморфизма генов, те же, что и используемые для поиска мутаций.

Важнейшим итогом исследований по изучению генома человека был серьезный прорыв в разработке удобных, недорогих и эффективных методов детекции мутаций, то есть определения количественных и качественных изменений первичной структуры молекулы ДНК [30, 142, 360].

Для поиска и идентификации мутаций (ДНК-полиморфизма) в настоящее время разработаны и широко применяются различные методы, общее число которых приближается к ста. Основу подавляющего большинства таких методов составляет знаменитая полимеразная цепная реакция (**ПЦР**), открытие которой принесло ее автору, американскому ученому Кэрри Муллису, Нобелевскую премию 1992 г. Перечень наиболее часто используемых в практике молекулярно-генетических методов приведен в таблице 4.1.

В зависимости от целей исследования все молекулярно-генетические методы можно подразделить на две группы: методы, направленные на поиск неизвестных мутаций (первичная идентификация) и анализ известных мутаций. Естественно, что в отличие от моногенных болезней, где нередко стоит задача идентификации неизвестной мутации в известном гене, при изучении аллельных ассоциаций МФЗ объектом иссле-

Таблица 4.1

Наиболее распространенные молекулярно-генетические методы идентификации мутаций

Молекулярно-генетические методы	
1.	Полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP)
2.	Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP)
3.	Расщепление резолвазой (EMD)
4.	Методы, основанные на лигазной реакции (LDL, LCR, Padlock)
5.	Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (расщепление Cleave I)
6.	Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD, AP-PCR)
7.	ПЦР с прямой терминацией синтеза (DT-PCR)
8.	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP)
9.	Гетеродуплексный анализ
10.	Секвенирование ДНК
11.	Минисеквенирование
12.	Аллель-специфическая ПЦР
13.	Масс-спектрометрия
14.	ПЦР в реальном времени
15.	Микрочипы

дования являются уже известные полиморфные сайты, информацию о которых можно найти в соответствующих ДНК-базах, опубликованных в Интернете (см. гл. 1, 2). Вместе с тем нам представляется целесообразным кратко рассмотреть базовые методы детекции мутаций (полиморфизма) и подробнее остановиться на наиболее перспективных современных методах молекулярно-генетического анализа полиморфных сайтов.

4.1. БАЗОВЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ

Одним из основных и исторически первым методом идентификации мутаций был **метод блот-гибридизации (Саузерн-блот)**, предложенный еще в 1975 году английским ученым Эдвардом Саузерном [731]. В течение почти 10 лет этот способ оставался единственным надежным методом детекции мутаций разных генов. Суть метода состоит в рестрикции геномной ДНК одной или несколькими эндонуклеазами с последующим разделением образовавшихся фрагментов ДНК по их молекулярной массе путем электрофореза в агарозном геле. Затем про-

водится блоттинг: фрагменты ДНК переносят на плотный носитель (целлюлозный фильтр или нейлоновую мембрану). Фиксированную на фильтрах ДНК гибридизуют с мечеными ДНК-зондами, позволяющими точно определить локализацию и, соответственно, размеры искомого геномного фрагмента ДНК. Необходимость работы с чистыми препаратами ДНК, применение радиоактивно меченых зондов, длительность и трудоемкость процедуры делают метод неудобным и дорогостоящим для практического использования. Тем не менее и в настоящее время различные варианты данного метода все еще находят применение в научных и диагностических целях. Прежде всего, это относится к гибридизации ДНК-зондов с электрофоретически разделенными молекулами РНК (Нозерн-блот), а также электрофоретически разделенных белков, фиксированных на фильтрах, с мечеными антителами (Вестерн-блот).

В настоящее время метод Саузерн-блот применяется для идентификации протяженных мутаций, затрагивающих структуру гена (большие делеции, инсерции, дупликации). Наличие протяженных делеций, инсерций, дупликаций, а также точечных мутаций в сайтах рестрикции приводит к изменению размеров рестрикционных фрагментов [86].

В отличие от метода блот-гибридизации, не представляющего интереса для тестирования генетического полиморфизма, **метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)**, предложенный в 1983 году, с полным правом можно рассматривать как базовый метод современной ДНК-диагностики. Применение ПЦР в течение часа приводит к увеличению в миллионы раз количества заданного фрагмента геномной ДНК, что существенно облегчает идентификацию искомой мутации или полиморфизма.

Принципиальная схема ПЦР показана на рисунке 4.1.

Реакция проводится в несколько последовательных этапов, для реализации которых широко используются специальные программируемые аппараты — **термоциклеры**, позволяющие задавать и поддерживать определенный температурный режим реакции. Все компоненты реакции — матричную ДНК, олигопраймеры, смесь дезоксинуклеотидов и термофильную ДНК-полимеразу — добавляют в специальный солевой буфер непосредственно перед помещением пробирки с реакционной смесью в термоциклер.

На первом этапе исследуемая двухнитевая матричная ДНК переводится в одонитевую форму путем ее нагревания в течение нескольких минут до температуры 94–98 °С. Дальнейшая схема заключается в чередовании циклов:

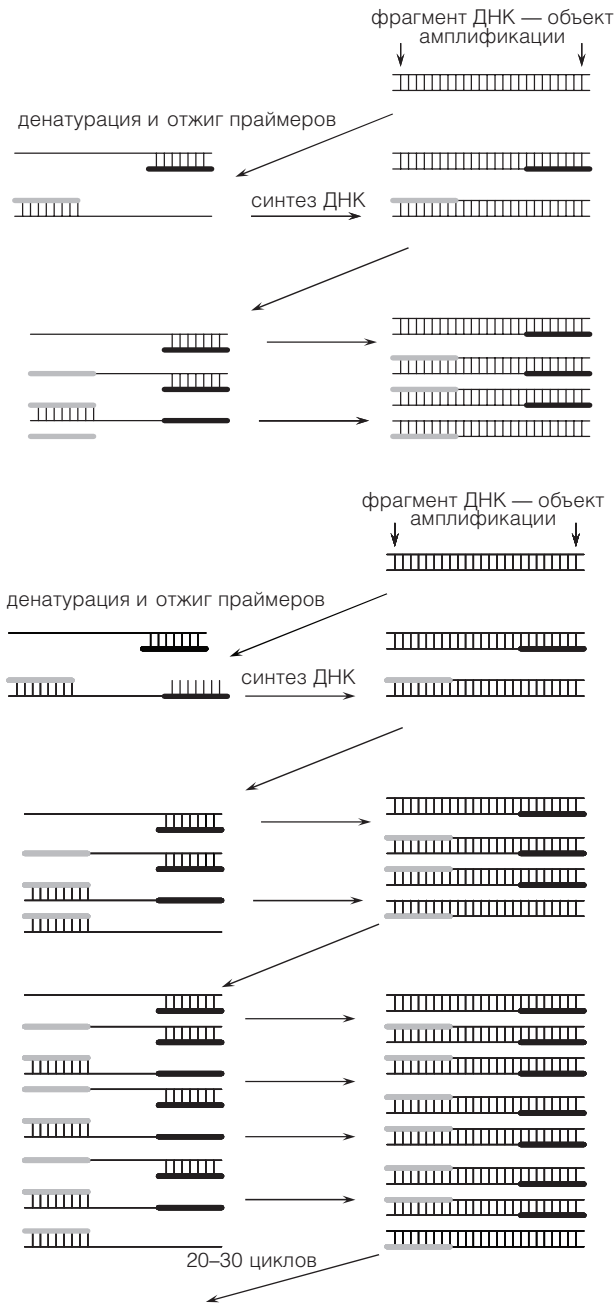


Рис. 4.1. Принципиальная схема полимеразной цепной реакции (пояснения в тексте)

- гибридизация или отжиг ДНК с праймерами;
- синтез последовательностей, комплементарных матричной ДНК;
- денатурация образовавшихся двухнитевых структур.

На этапе гибридизации температура реакционной смеси снижается до +50–65 °С. Находящиеся в растворе олигопраймеры гибридизуются с денатурированной (одноцепочечной) геномной ДНК, содержащей комплементарные (соответствующие им) участки.

Повышение температуры до +65–72 °С, оптимальной для работы термофильной Taq1 ДНК-полимеразы, запускает синтез ДНК в направлении от 5' к 3'-концу геномной ДНК-матрицы. При дальнейшем повышении температуры до +80–90 °С синтез ДНК прекращается, происходит денатурация с освобождением с геномной матрицы уже синтезированных фрагментов ДНК, которые, в свою очередь, становятся матрицами для синтеза ДНК при последующих циклах амплификации.

Таким образом, в каждом цикле происходит увеличение числа синтезированных копий участка амплификации, причем содержание продуктов амплификации нарастает в геометрической прогрессии. В среднем один полный цикл денатурация — гибридизация — синтез — денатурация длится одну-три минуты. За 25–30 циклов число синтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов. Выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка.

При помощи ПЦР можно идентифицировать многие мутации, а также изучать полиморфные сайты. Подбор олигопраймеров проводят на основании анализа нуклеотидных последовательностей в участках ДНК, фланкирующих ту или иную мутацию. Разработаны различные варианты автоматического выбора олигопраймеров, оптимальных для получения различных амплификатов (программы «Oligo 6», «Prime-3» и другие).

Подбор праймеров целесообразно проводить согласно следующим критериям:

- отсутствие внутренней вторичной структуры;
- сбалансированный состав и равномерное распределение G/C и A/T пар по всей последовательности;
- отсутствие комплементарности между 3'-концами (из-за существования опасности образования димеров праймеров);
- наличие единой температуры плавления (разброс температур плавления праймеров не более 1 °С от среднего значения);

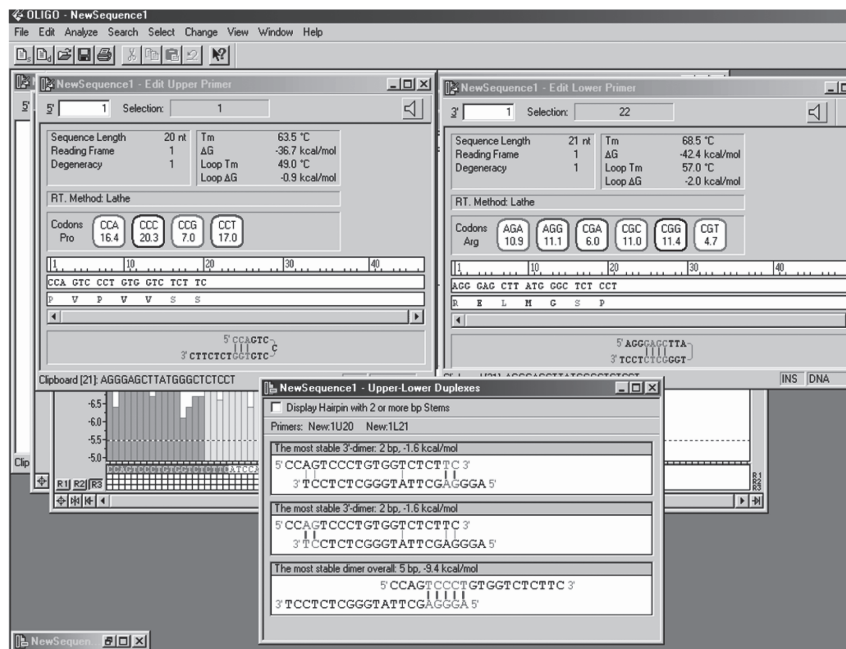


Рис. 4.2. Интерфейс программы «Oligo 6» (этап анализа, направленного на поиск наличия/отсутствия димеров между праймерами) (пояснения в тексте)

- отсутствие комплементарности последовательностей праймеров с последовательностями других генов в геноме человека.

На рисунке 4.2 приведен интерфейс программы «Oligo 6», используемой при подборе праймеров первого раунда для гена *MTHFR*. Этап анализа по выявлению наличия/отсутствия димеров между праймерами (F и R).

В ряде случаев, особенно при идентификации разных мутаций в одном гене, проводят одновременную амплификацию нескольких участков матричной ДНК. Такую модификацию метода называют **мультиплексной ПЦР**. Она широко используется для идентификации мутаций в гене *CFTR* (муковисцидоз), в гене дистрофина (миодистрофия Дюшенна), при поиске аллельных ассоциаций в случае МФЗ.

Анализ результатов ПЦР проводят путем гель-электрофореза продуктов амплификации, которые при необходимости обрабатывают соответствующими **эндонуклеазами**. В дальнейшем гели окрашивают красителем этидием бромидом и визуализируют продукты ПЦР (рестрикции) в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 380 нм. Кроме того, продукты амплификации можно идентифицировать путем

блот-гибридизации со специфическими ДНК-зондами или другими методами окрашивания.

Подробно с техникой постановки ПЦР, ее многочисленными модификациями, а также с методами анализа ДНК, основанными на применении ПЦР, можно ознакомиться в следующих монографиях и методических руководствах [86, 87, 103, 211]. Некоторые из этих методов кратко рассмотрены в следующих разделах данной главы.

Следует отметить, что ПЦР, безусловно, самый часто используемый молекулярный метод, позволяющий не только идентифицировать многие уже известные мутации, но и лежащий в основе более сложных современных методов изучения генома, например метода чиповой диагностики (см. ниже).

4.2. ПЕРВИЧНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ

Как уже отмечалось, поиск неизвестных мутаций обычно не актуален при генотипировании МФЗ, задача которого подтвердить или отвергнуть аллельную ассоциацию того или иного гена-кандидата с каким-то заболеванием или его отдельными клиническими проявлениями. Тем не менее, опыт показывает, что многие МФЗ (остеопороз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эссенциальная гипертензия, семейная гиперхолестеринемия или ожирение) наряду с доминирующим полигенным вариантом наследования иногда могут быть следствием мутаций единичных генов, то есть имеют моногенную природу. В этих достаточно редких случаях актуальным становится идентификация мутаций в соответствующих генах. Методы, применяемые для первичной идентификации мутаций, то есть позволяющие скринировать на наличие ДНК-поломок достаточно протяженные фрагменты генов, включают:

- 1) метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP — Single Strand Conformation Polymorphism);
- 2) денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE — Denaturing Gradient Gel Electrophoresis);
- 3) метод гетеродуплексного анализа (НА — Heteroduplex Analysis);
- 4) метод химического расщепления некомплементарных сайтов (СМС — Chemical Mismatch Cleavage);
- 5) метод тестирования «неполноценного» белка (РТТ — Protein Truncated Test);
- 6) метод масс-спектрометрии и метод биочипов (см. раздел 4.4).

Таблица 4.2

Преимущества и недостатки различных методов детекции мутаций

Название метода	Размер исследуемого участка ДНК, п. о.	Чувствительность метода, %	Локализация	Токсичность	Сканирование экзонов	Сканирование мРНК
SSCP	250	80	Нет	Нет	+++	+
DGGE	600	95	Нет	Формамид	++	++
CMC	1700	>95	Да	Да	+	+++
PCR DS	500	>95	Да	Нет	++	++
HA	300	80	Нет	Нет	++	+

Основные характеристики некоторых методов приведены в таблице 4.2.

Выявление мутаций этими методами должно обязательно подтверждаться результатами прямого секвенирования изучаемого ДНК-фрагмента гена. Таким образом, большинство перечисленных методов (за исключением масс-спектрометрии и биочипов) позволяет выявить только подозрительные на наличие точковых и других мутаций участки ДНК, и только метод секвенирования дает полную информацию о типе и характере нуклеотидных изменений. Зачастую первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена проводят именно таким образом. Разработанные в последние годы модификации метода ПЦР значительно облегчают секвенирование амплифицированных фрагментов и повышают его эффективность. Подробно с деталями и возможностями данных методов можно ознакомиться в следующих руководствах и обзорах [86, 87, 103, 211].

4.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗВЕСТНЫХ МУТАЦИЙ

В настоящее время идентифицированы сотни генов, мутации в которых приводят к различным моногенным заболеваниям, и являющихся генами-маркерами МФЗ. Для многих из них уже созданы банки мутаций (см. табл. 4.3), идентифицированы мажорные, то есть наиболее часто встречающиеся мутации, выявлены участки повышенной мутабельности («горячие точки»), разработаны алгоритмы молекулярной диагностики. В случае наиболее частых наследственных болезней (муковисцидоз, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшенна, серповидно-клеточная анемия и др.) созданы коммерческие наборы, позволяющие выявлять в автоматическом режиме сразу несколько диагностически наиболее важных мутаций.

Таблица 4.3

Адреса в Интернете для доступа в банк данных наиболее частых моногенных и некоторых мультифакториальных наследственных болезней

ЗАБОЛЕВАНИЕ	ИНТЕРНЕТ-САЙТ
Муковисцидоз	http://www.genet.sickkids.on.ca.cftfr/
Миодистрофия Дюшенна	http://www.dmd.nl
Гемофилия	http://europium/mrc.rpms.axc.ulc
Поликистоз почек	http://medoc.gdb.org/pkd
Рак груди и яичников	http://www.nhgri.nih.gov/intramural_research/lab_transfer/bic.member/index.htm
Семейный полипозный рак толстой кишки	http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi./APC.htm
Наследственный неполипозный рак толстой кишки	http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm
Семейная гиперхолестеринемия	http://www.ucl.ac.uk/fh/

Из точечных мутаций и полиморфных сайтов наиболее просто диагностируются замены нуклеотидов, которые приводят к исчезновению или образованию сайта узнавания какой-нибудь из рестриктаз (эндонуклеаз). Данный тип мутаций выявляется после обработки амплифицированного фрагмента ДНК, содержащего мутацию, соответствующей эндонуклеазой, при этом изменяется количество и молекулярный вес фрагментов ДНК. Поэтому сразу после идентификации новой мутации проводится компьютерный поиск возможных сайтов рестрикции в месте локализации замены основания. Вероятность такого события довольно велика, так как для каждой из нескольких сотен известных в настоящее время рестрикционных эндонуклеаз сайтом узнавания служит своя специфическая последовательность ДНК, средние размеры которой составляют 5–6 нуклеотидов.

Если естественных рестрикционных сайтов в месте мутации найти не удастся, то такие сайты могут быть созданы искусственно. Ниже приведены некоторые из методов, специально разработанных для детекции некоторых частых мутаций и полиморфных сайтов.

4.3.1. Метод ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза [272]

Амплифицируемый участок ДНК выбирают таким образом, чтобы 3'-конец одного из праймеров непосредственно примыкал к мутантному

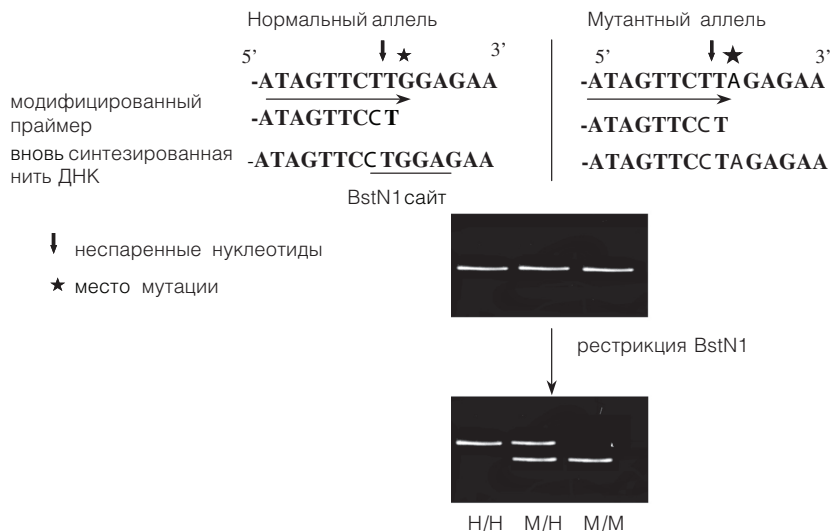


Рис. 4.3. Принцип метода ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза (стратегия определения мутации G542X при муковисцидозе) (пояснения в тексте)

сайту (рис. 4.3). В нем изменяют один из нуклеотидов с 3'-конца так, чтобы в сочетании с нуклеотидом мутантного сайта в этом месте образовывался или исчезал сайт рестрикции для какой-нибудь из эндонуклеаз. Таким образом, ПЦР-продукты с нормального и мутантного аллелей отличаются по наличию индуцированного сайта рестрикции. Например, если сайт рестрикции индуцирован в мутантном аллеле, то после обработки ПЦР-продукта соответствующей эндонуклеазой на электрофореграмме при отсутствии мутации будет определяться один фрагмент, у гетерозигот — два дополнительных фрагмента, соответствующих по длине рестрицированным участкам ДНК, а у гомозигот будут присутствовать только эти два фрагмента.

4.3.2. Амплификация рефрактерной мутационной системы

Концептуально близким к этому варианту является метод «амплификации рефрактерной мутационной системы» — **amplification refractory mutation system — ARMS** [255, 385]. Суть метода заключается в параллельной постановке двух ПЦР, для каждой из которых одним из праймеров служит аллель-специфическая мутантная или нормальная олигонуклеотидная последовательность соответственно (рис. 4.4). При этом в качестве второго праймера в двух реакциях выбирают одну и ту

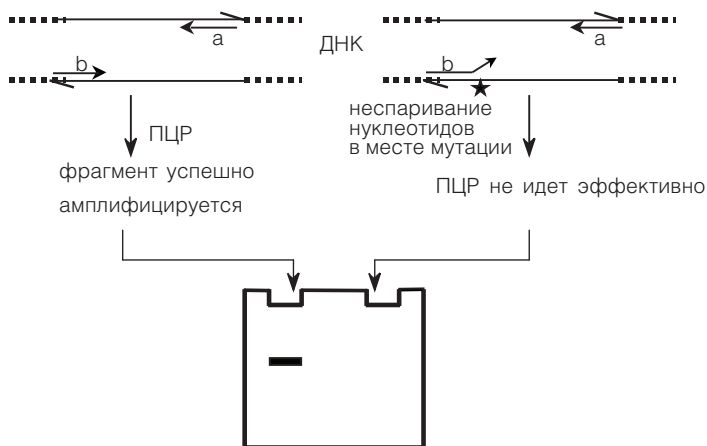


Рис. 4.4. Принцип метода ARMS (amplification refractory mutation system) — амплификации рефрактерной мутационной системы (пояснения в тексте)

же олигонуклеотидную последовательность, так что в обоих случаях могут амплифицироваться участки ДНК одинаковой протяженности. При наличии мутации в исследуемой ДНК амплифицированные фрагменты образуются только в том случае, если в качестве аллель-специфического праймера выбирается мутантная последовательность, тогда как при использовании нормального олигонуклеотидного праймера ПЦР блокируется. Метод нашел широкое применение для детекции мутаций при фенилкетонурии, бета-талассемии, муковисцидозе, при типировании генов HLA системы. Однако сложности в подборе праймеров и в выборе оптимального режима ПЦР ограничивают широкое применение этого метода. Его несомненным преимуществом является возможность применения полностью автоматического сканирования.

4.3.3. Лигирование синтетических олигонуклеотидных зондов

Таким же преимуществом обладают и методы детекции мутаций, основанные на лигировании синтетических олигонуклеотидных зондов — OLA (oligonucleotide ligation assay) [559]. ДНК-зонды для лигирования подбирают таким образом, чтобы они были полностью комплементарны нормальному фрагменту ДНК в области локализации мутации, причем сама нуклеотидная замена должна находиться на стыке двух праймеров. После гибридизации синтезированные олигонуклеотидные последовательности сшивают ДНК-лигазами, выделенными

из термофильных микроорганизмов. При наличии мутации в тестируемой молекуле ДНК на конце одного из зондов образуется сайт некомплементарного спаривания, непосредственно примыкающий к месту лигирования. Сшивки между зондами в этом случае не происходит. Метод включает несколько последовательных циклов гибридизации, лигирования и денатурации. В дальнейшем проводят электрофоретический анализ меченых одностранных фрагментов ДНК.

4.3.4. Метод аллель-специфических олигонуклеотидов

Универсальным методом детекции замен оснований является **метод аллель-специфических олигонуклеотидов — ASO**, который включает амплификацию фрагментов ДНК и последующую гибридизацию с мечеными аллель-специфическими олигонуклеотидами [707]. Для этого синтезируют два типа олигонуклеотидных последовательностей, обычно размером 19 п. о., в которых мутантный сайт занимает центральное положение. Каждый из этих олигонуклеотидных зондов комплементарен нормальному или мутантному вариантам ДНК соответственно. Условия гибридизации подбирают таким образом, чтобы стабильные дуплексы образовывались только при полной комплементарности гибридных пар. В этих условиях амплифицированные фрагменты ДНК без мутации будут гибридизоваться только с нормальным зондом, ДНК гомозигот по мутации — только с мутантным и ДНК гетерозигот — с обоими маркерными зондами. Разработаны удобные модификации этого метода с использованием аллель-специфических ДНК-зондов, меченных биотином или пероксидазой хрена.

4.3.5. ПЦР в реальном времени

Широко распространенным методом детекции известных мутаций является метод **ПЦР в реальном времени**. Чаще всего используют так называемое резонансное тушение флуоресценции в TaqMan системе, позволяющее контролировать кинетику ПЦР амплификации непосредственно в ходе реакции [89, 467, 486]. Для детекции мутаций используют зонды, несущие на 5' и 3' концах соответственно различные флуорофоры (светители) и их «тушители» (quencher), которые, находясь рядом, подавляют флуоресценцию (рис. 4.5). При этом зонды должны быть комплементарны последовательности амплифицируемой ДНК и отличаться лишь одним нуклеотидом, характерным для одного и другого аллеля. Зонд, содержащий на 3' конце краситель FAM, полностью комплементарен

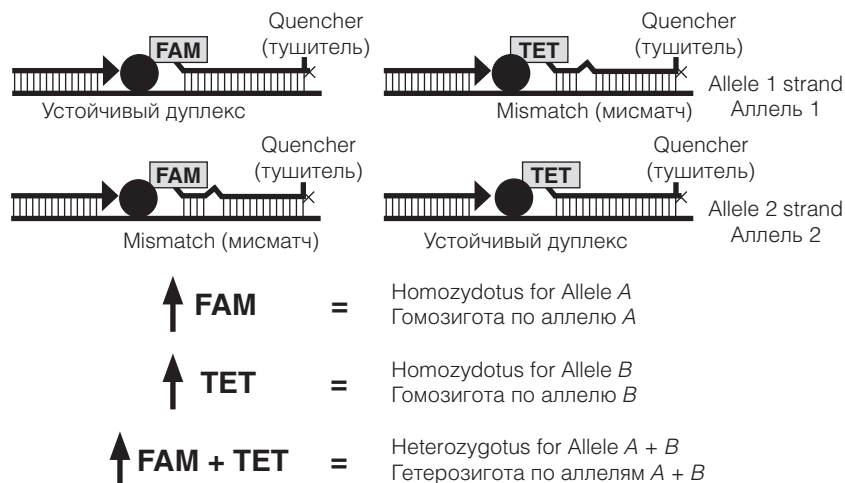


Рис. 4.5. Определение аллельного полиморфизма с помощью 5'-нуклеазного (TaqMan) анализа (пояснения в тексте)

аллелю 1 и при гибридизации дает устойчивый дуплекс. При гибридизации этого зонда с аллелем 2 будет происходить неполное спаривание нуклеотидов и возникает так называемый «мисматч» (mismatch). Соответственно зонд, имеющий метку ТЕТ, полностью комплементарен аллелю 2, но при гибридизации с аллелем 1 не дает устойчивого дуплекса.

Непосредственно перед реакцией в ПЦР-смесь добавляют зонды, которые гибридизуются с комплементарными им последовательностями ДНК. В случае гетерозиготы по исследуемым аллелям гибридизуются оба зонда.

Достраивая комплементарную последовательность ДНК, Taq-полимераза за счет своей экзонуклеазной активности разрушает только устойчивые дуплексы. При этом происходит отщепление соответствующего флюорофора, который переходит в раствор и, не находясь под влиянием «тушителя», дает свой флюоресцентный сигнал. В зависимости от сигнала свечения можно судить каким аллелем (аллелями) представлен данный образец ДНК. Интенсивность сигнала флюоресценции зависит от числа циклов ПЦР. Размер амплифицируемого фрагмента ДНК обычно не превышает 150 нуклеотидов, что серьезно ограничивает применение этого метода. Вместе с тем прохождение реакции можно контролировать в реальном времени, что является его главным преимуществом. Для того, чтобы диагностировать наличие мутации, иногда достаточно провести менее 25 циклов амплификации.

4.4. НОВЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА

Наиболее удобными и экономичными для массового автоматического и полуавтоматического исследования частых мутаций и аллельного полиморфизма являются следующие методы:

- 1) денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения — DHPLC (Denaturation High Performance Liquid Chromatography);
- 2) метод поверхностного плазмонного резонанса — SPR (Surface Plasmon Resonance);
- 3) методы ДНК-чипов;
- 4) метод масс-спектрометрии.

4.4.1. Метод DHPLC

Метод DHPLC предложен в 1995 году [635], позволяет в течение 2–3 минут определять однонуклеотидные замены, делеции и инсерции в амплификатах размерами до 1,5 т. п. о. Чувствительность и специфичность метода составляют около 95%. Метод представляет собой модифицированный вариант метода гетеродуплексного анализа с последующим автоматическим учетом результатов при помощи жидкостного хроматографа. Согласно методу DHPLC-продукты ПЦР исследуемого фрагмента ДНК подвергаются частичной денатурации в растворе с контрольными образцами того же фрагмента в соотношении 1:1 путем нагревания смеси до +95 °С с последующим медленным охлаждением (ренатурацией). При отсутствии мутаций в изучаемом фрагменте формируется только один тип гомодуплексов, но при наличии мутаций формируется несколько типов гетеродуплексов и гомодуплексов (рис. 4.6). Возникающие гетеродуплексы значительно менее устойчивы к температурным воздействиям, чем гомодуплексы. Эти отличия и можно уловить с помощью жидкостной хроматографии. Метод позволяет в автоматическом режиме улавливать наличие некомплементарных (неспаренных) сайтов между опытными и контрольными образцами ДНК. Предварительный подбор оптимальных температур плавления гомо- и гетеродуплексов резко повышает чувствительность метода DHPLC по сравнению с SSCP методом (см. выше) или исходным методом гетеродуплексного анализа (см. выше) [133, 278, 429, 566].

Метод DHPLC уже широко применяется для генотипирования однонуклеотидных замен (SNP), при первичном анализе полиморфных

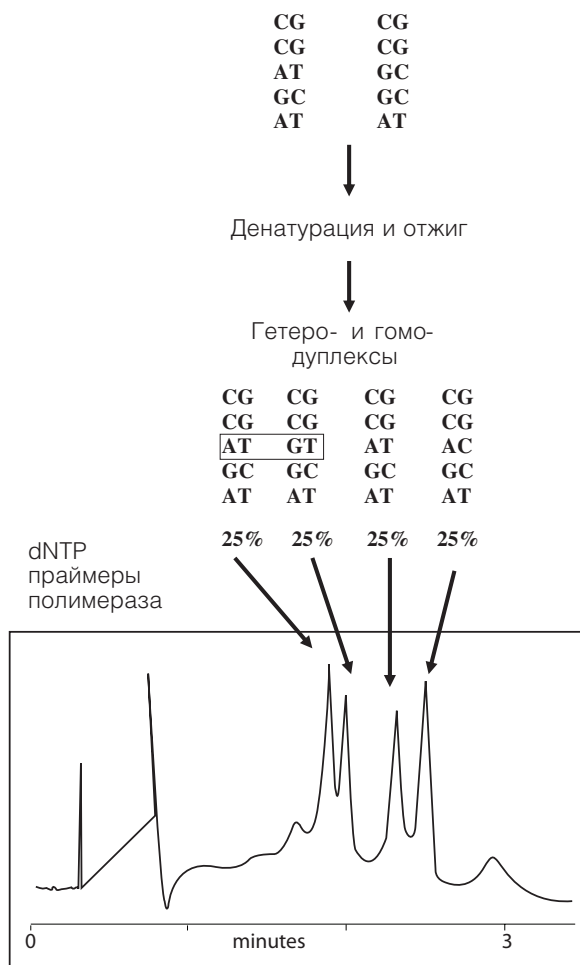


Рис. 4.6. Схема проведения DHPLC-анализа (пояснения в тексте)

сайтов в генах-кандидатах, ассоциированных с МФЗ, при изучении молекулярных маркеров и мутаций в Y-хромосоме, для картирования генов с помощью типирования маркерных SNP.

4.4.2. SPR-метод

SPR-метод основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance). Данное явление представляет собой квантовый оптико-электронный феномен, возникающий при взаимодействии поляризованного света определенной длины волны с поверх-

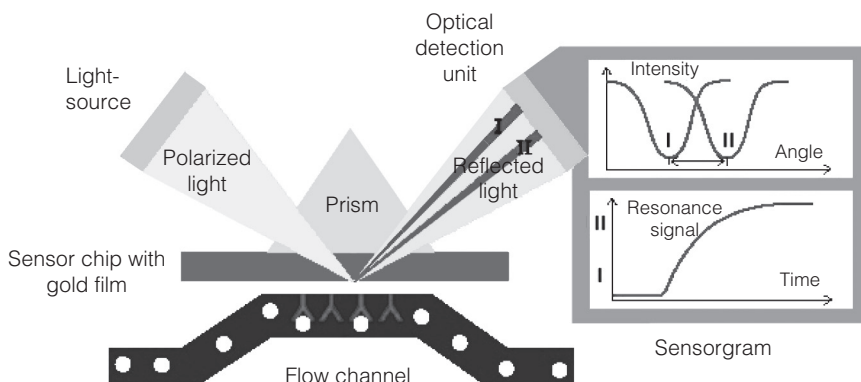


Рис. 4.7. Принцип SPR-анализа (пояснения в тексте)

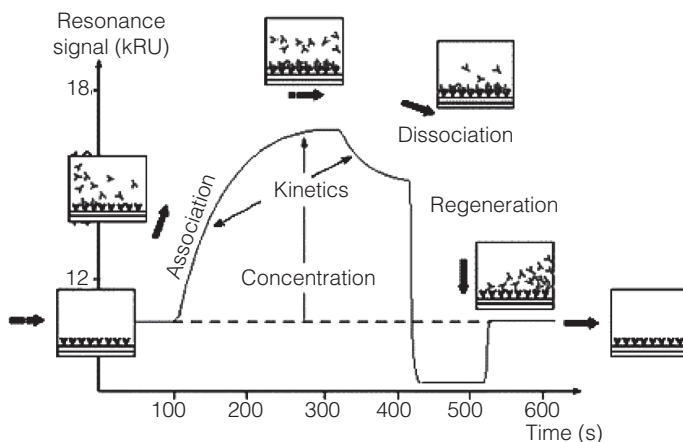


Рис. 4.8. Схема сенсорграммы (пояснения в тексте)

ностью металла. SPR-технология позволяет детектировать биомолекулы (ДНК) и контролировать процесс связывания между двумя и более молекулами в режиме реального времени. Взаимодействие фрагментов ДНК приводит к изменению показателя преломления света в поверхностном слое чувствительного датчика, которое фиксируется как изменения в интенсивности сигнала SPR (рис. 4.7). Важно отметить, что одна из взаимодействующих молекул должна быть иммобилизована на поверхности чувствительного датчика (sensor chip). Взаимодействие молекул в реальном времени отражается на сенсорограмме (рис. 4.8). Уже в процессе введения образца проба связывается с иммобилизованными на поверхности чувствительного датчика олигонуклеотидами,

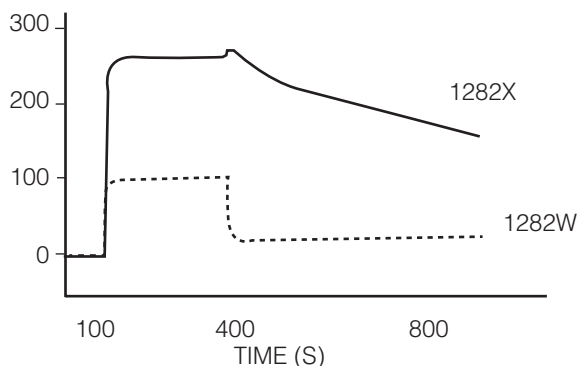


Рис. 4.9. Пример использования SPR-метода для анализа мутаций X1282W в гене *CFTR* (пояснения в тексте)

при этом увеличивается сигнал SPR. В конце введения образца проба заменяется непрерывной струей буфера, и уменьшение сигнала SPR отражает диссоциацию пробы от поверхностно-связанного комплекса. В зависимости от нуклеотидного состава исследуемой молекулы ДНК характер ассоциации и диссоциации меняется и, соответственно, меняется сенсорограмма (рис. 4.9).

4.4.3. Методы ДНК-чипов

Важной инновацией молекулярной биологии стала технология биологических микрочипов. Эта технология позволяет использовать сравнительно небольшие количества исходного материала, проводить реакцию в микрообъемах, одновременно осуществлять многопараметрический анализ множества генов одного и того же объекта. Ее чувствительность сопоставима со стандартными амплификационными методами ДНК-диагностики и в некоторых случаях превосходит их [137, 350, 543, 601].

В зависимости от природы иммобилизованных зондов различают 4 основные типа биочипов:

- **ДНК-чипы;**
- **РНК-чипы;**
- **белковые микрочипы;**
- **клеточные микрочипы.**

Наибольшее распространение в исследовательской и клинической практике, особенно для анализа спектра различных мутаций или

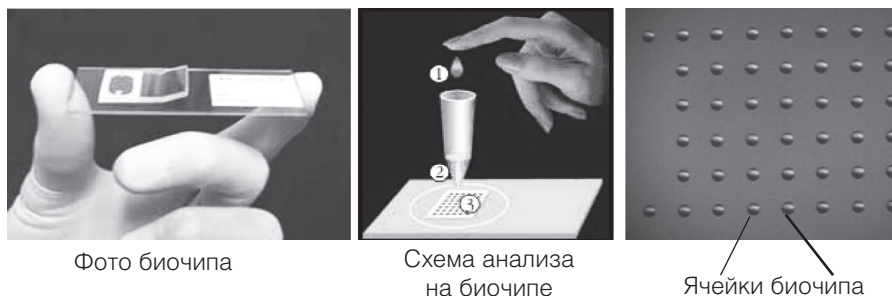


Рис. 4.10. Биологический микрочип и схема ДНК-анализа (1 — выделение ДНК из биологического материала, 2 — проведение ПЦР, 3 — гибридизация на биочипе) (пояснения в тексте)

аллельных вариантов разных генов, получили ДНК-чипы. В типичном варианте они представляют собой миниатюрные гелевые пластинки с многочисленными углублениями, ячейками, содержащими набор ДНК-зондов (рис. 4.10), расположенными на стекле или мембране. За последние десять лет технология микрочипов превратилась в бурно развивающееся прикладное направление биологической науки: десятки фирм разрабатывают и предлагают биологические микрочипы, содержащие массивы от нескольких десятков до сотен тысяч и более ДНК-зондов [573]. С помощью биочипов можно также анализировать и такие изменения ДНК, как транслокации, дупликации, протяженные делеции, а также микродупликации и микроделеции [14, 84, 150, 194, 356, 702, 802].

Технологии изготовления ДНК-чипов различаются размером наносимых фрагментов ДНК, методами иммобилизации, процедурами гибридизации и системами детекции [466, 573]. По конечному этапу детекции микрочипы бывают двух типов: **гибридизационные** и **ферментативные**. Гибридизационные чипы в зависимости от способа считывания сигнала подразделяются на электронные (фирма “Nanogen”) и флюоресцентные (фирмы “Affymetrix”, “Illumina”, «Биочип») и т. д. [Биочип: www.biochip.ru; Affymetrix: www.affymetrix.com; Applied Biosystems: www.europe.appliedbiosystems.com; Asper Biotech: www.asperbio.com; Illumina: www.illumina.com; Nanogen: www.nanogen.com].

При этом дискриминация мутаций может происходить как до гибридизации, то есть еще в процессе подготовки пробы (чипы фирм “Applied Biosystems”, “Affymetrix”), так и в процессе гибридизации (фирма «Биочип»). Для примера проиллюстрируем гибридизацион-

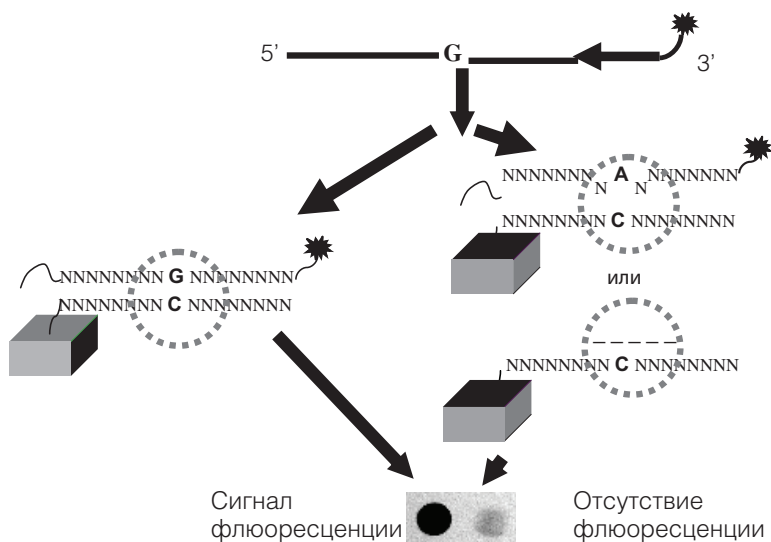


Рис. 4.11. Метод анализа мутаций на основе аллель-специфичной гибридизации, разработанный в ИМБ РАН (пояснения в тексте)

ные методы анализа мутаций, используемые фирмами «Биочип» (1) и «Affymetrix» (2).

1. Предложенная и разработанная в России технология микрочипов (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН) предполагает предварительную мультиплексную амплификацию исследуемых фрагментов ДНК с использованием флуоресцентно меченных праймеров (или дезоксинуклеотидтрифосфатов) [543, 648, 770]. В результате добавления избытка одного из праймеров и проведения 2 раундов репликации достигается образование большого количества преимущественно меченого одноцепочечного продукта. Последний наносят на биочип, где он гибридизуется с иммобилизованными в геле олигонуклеотидными зондами (рис. 4.11). Если последовательность анализируемой ДНК полностью комплементарна последовательности ДНК-зонда, образуется стабильный дуплекс, который легко детектируется благодаря флуоресцентной метке. Однако, если искомого фрагмента нет или в нем присутствует некомплементарное основание, то стабильный дуплекс не возникает (сигнал флуоресценции отсутствует). Данный метод позволяет анализировать до 50 полиморфных вариантов с точностью более 98%.

2. Для анализа генетического полиморфизма и мутаций, используя технологию “Affymetrix” [www.affymetrix.com], предполагается при-

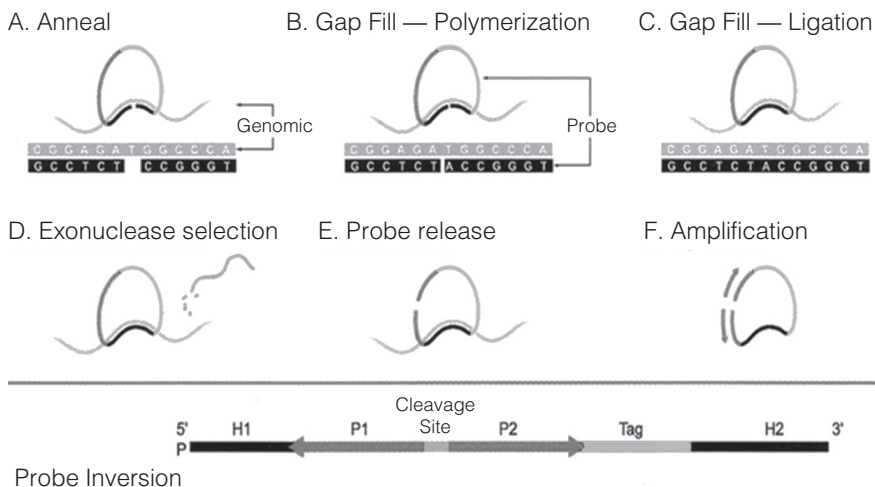


Рис. 4.12. Метод подготовки проб для анализа однонуклеотидных мутаций фирмы "Affymetrix" (пояснения в тексте)

менение так называемых «специальных проб». Такие пробы состоят из нескольких фрагментов: **H1** и **H2** — специфичных для анализируемой последовательности ДНК; **P1** и **P2** — являющихся универсальными праймерами и фланкирующих сайт для фермента клевазы; и tag-последовательности — специфической метки для выявления определенного SNP при гибридизации на микрочипе (рис. 4.12). Детекция мутаций происходит следующим образом: в исследуемый образец, содержащий одноцепочечную ДНК с искомой мутацией, добавляют «специальную пробу». Проба комплементарно гибридизуется с последовательностью ДНК анализируемого образца (фрагментами H1 и H2) (рис. 4.12 А). Далее добавляют термостабильную ДНК-полимеразу и четыре разных нуклеозидтрифосфата (используют, соответственно, четыре пробирки). ДНК-полимераза достраивает 3'-конец пробы H1 на одно основание, соответствующее вариабельной позиции (рис. 4.12 В). Затем проводят лигазную реакцию, при которой происходит соединение 5'-конца встроенного основания с 3'-концом пробы H2 (рис. 4.12 С). На следующей стадии (рис. 4.12 D) экзонуклеаза разрушает оставшуюся ДНК исходного образца. С целью дальнейшей амплификации кольцевую молекулу пробы разрезают клевазой (рис. 4.12 Е). Амплификацию проводят с использованием универсальных праймеров P1 и P2 (рис. 4.12 F). Далее пробы гибридизуют с микрочипом. Специфичность гибридизации достигается за счет специально сконструированного

tag-фрагмента, который, наряду с универсальными праймерами, является одним из ноу-хау фирмы “Affymetrix”. Таким образом, в исследуемом образце можно однозначно выявлять до 1000 и более SNPs. Точность метода при анализе тысячи SNPs составляет около 90%.

3. Еще один из перспективных вариантов биочипов для анализа генетического полиморфизма сконструирован на основе метода **SBE (single base primer extension** — удлинение праймера на одно основание), позволяющего достигать высокой степени дискриминации гибридных сигналов на аллелях «мутантного» и «дикого» типов. При подготовке проб предварительно амплифицируют исследуемый фрагмент ДНК, содержащий маркерный SNP, после чего проводят его гибридизацию на биочипе. Последовательность зонда должна быть комплементарна последовательности исследуемой ДНК, включая его последнее основание на 3'-конце, после которого следует переменный нуклеотид. Принцип детекции заключается в следующем: после гибридизации зонда с образцом в реакцию добавляют меченные разными красителями дидезоксинуклеотиды и ДНК-полимеразу. Благодаря присутствию дидезоксинуклеотидов возможно присоединение только одного-единственного нуклеотида к 3'-концу иммобилизованного зонда. После отмывки чипа флюоресценция тестируемой пробы определяется именно этим меченым дидезоксинуклеотидом. По степени дискриминации между гомозиготными и гетерозиготными генотипами метод SBE в среднем на порядок превосходит гибридизацию с аллель-специфичными зондами [601]. Недостатки этого метода состоят в необходимости синтеза олигонуклеотидов, иммобилизованных на чипе со свободным 3'-концом, что исключает применение метода для наиболее перспективного типа чипов, создаваемых способом фотолитографии.

4. Концептуально близкой технологии SBE являются биочипы, созданные на основе метода **APEX (arrayed primer extension** — достройка праймеров, синтезированных на обеих цепях ДНК). Отличие состоит в том, что при анализе тестируется не одна, а сразу обе цепи ДНК и используются несколько различных иммобилизованных зондов для каждой позиции. Это дает возможность идентифицировать с высокой степенью надежности новые мутации и полиморфные сайты. Чипы на основе APEX-технологии разработаны эстонской фирмой «Asper Biotech» [www.asperbio.com], показаны на рисунке 4.13.

5. Несколько вариантов гибридизационных биочипов были разработаны на базе НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН. С помощью одного из

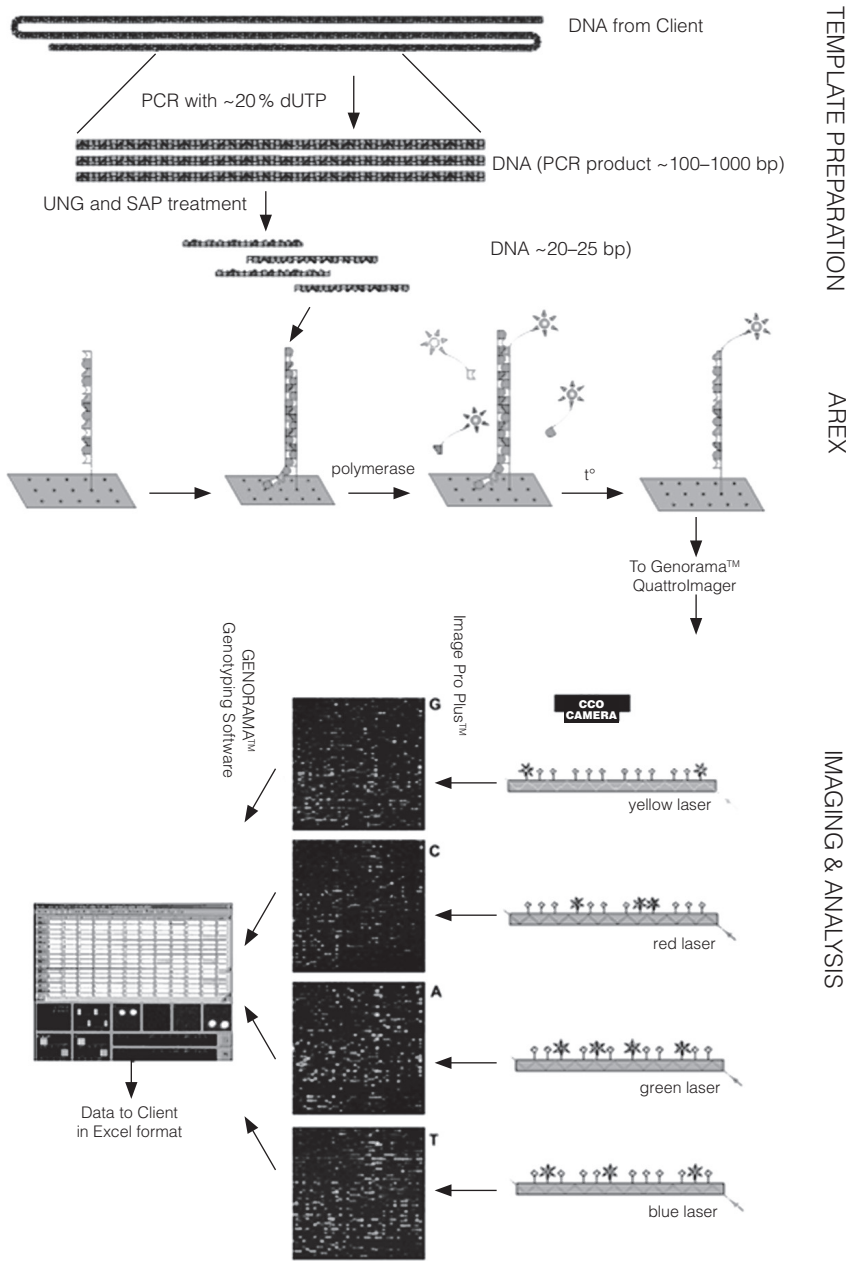


Рис. 4.13. Мини-секвенирование на микрочипах («Asper Biotech») (пояснения в тексте)

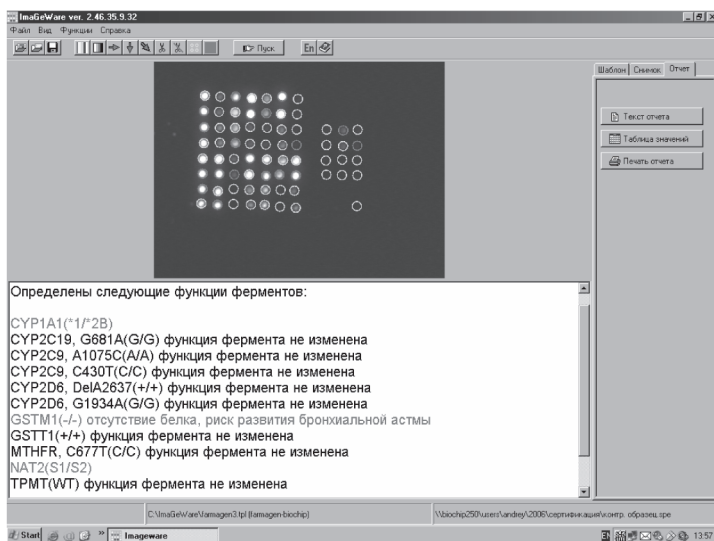


Рис. 4.14. Интерфейс программы «ImageWare» для анализа результатов генотипирования при помощи «фармакогенетического биочипа» (пояснения в тексте)

них — «фармакогенетического биочипа» — можно изучать наследственную предрасположенность к привычной невынашиваемости беременности и к лейкозам у детей [150, 194]. Биочип позволяет проводить анализ 13 аллельных полиморфных сайтов 7 генов системы детоксикации: *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G и 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A и 2637delA), *GSTM1* (делеция), *GSTT1* (делеция), *NAT2* (481T>C, 590A>G и 857A>G), *CYP2C9* (430C>T и 1075C>T) и *CYP2C19* (681G>A) и одного (677C>T) гена метилентетрагидрофолиевой кислоты — *MTHFR*. На рисунке 4.14 приведены результаты биочипового анализа с применением специального программного обеспечения. «Фармаген-биочип» уже прошел клинические испытания и внедрен в практику лабораторной диагностики нескольких медицинских центров РФ. На стадии клинических испытаний находятся биочипы для тестирования наследственной предрасположенности к тромбофилии («ТРОМБО-биочип») и к сердечно-сосудистым заболеваниям («Кардио-биочип») [97]. Ведется работа по созданию биочипов по тестированию основных мутаций в гене *CFTR* при муковисцидозе, а также наследственной предрасположенности к бронхиальной астме и остеопорозу.

6. Особого внимания заслуживают биочипы, позволяющие осуществлять **общегеномный скрининг ассоциаций (Genome Wide Association Studies — GWAS)** [www.affymetrix.com и www.illumina.com],

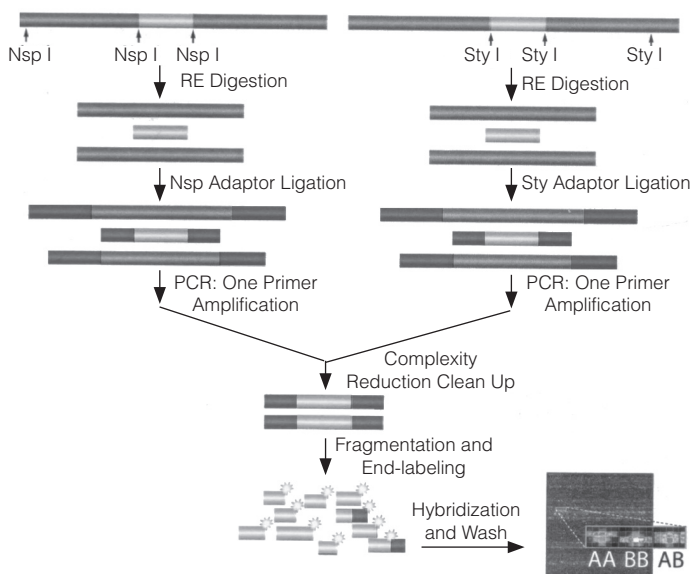


Рис. 4.15. Технология полногеномного скрининга фирмы “Affimetrix” (пояснения в тексте)

в результате которого становится возможной идентификация всех генов-маркеров, геномных локусов и отдельных маркерных SNP, ассоциированных с различными МФЗ (см. гл. 2, 3, 9). С этой целью исследуемый образец ДНК подвергают гидролизу определенными эндонуклеазами, образовавшиеся фрагменты лигируют (сшивают) с адаптерными последовательностями ДНК и амплифицируют с одним праймером, специфичным исследуемому фрагменту генома. Полученные фрагменты ПЦР метят флуоресцентными красителями и гибридизуют с наборами ДНК-зондов, находящихся на биочипе (рис. 4.15). По результатам анализа гибридизационной картины биочипа с помощью специальной компьютерной программы судят о наличии в исследованном образце того или иного набора аллельных вариантов однонуклеотидных замен — SNP (рис. 4.16). Сопоставление частот соответствующих аллелей у больных и здоровых индивидов позволяет идентифицировать все SNP и, соответственно, все гены и ДНК-локусы, ассоциированные с конкретной болезнью, то есть выяснить специфический генетический профиль МФЗ. Метод позволяет в одном анализе исследовать до нескольких десятков и сотен тысяч маркеров, однако его точность не превышает 90 %. Поэтому на современном эта-

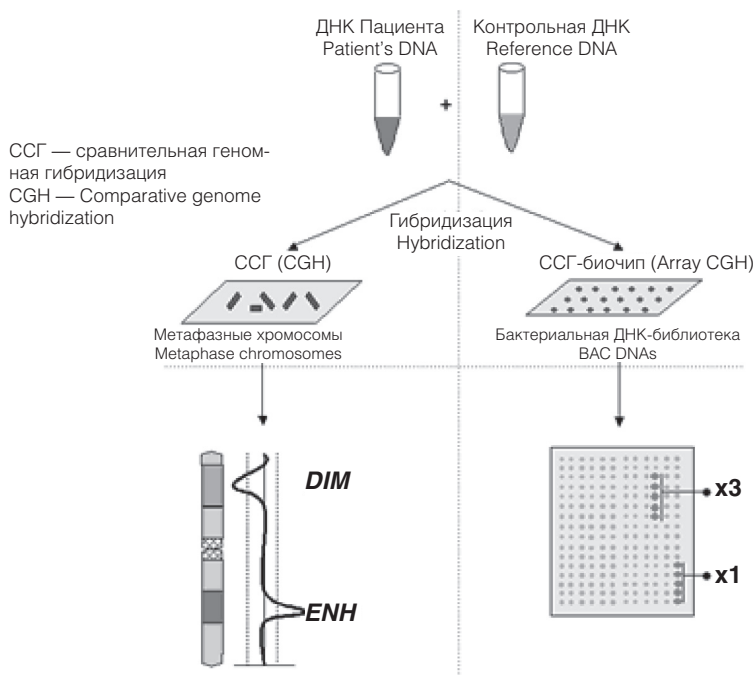


Рис. 4.16. Принцип метода сравнительной геномной гибридизации (<http://www.implen.de/product.php?id=41>) (пояснения в тексте)

пе данный метод следует рассматривать скорее как поисковый, но не диагностический. В настоящее время метод с успехом применяется для полногеномного скрининга ассоциаций различных МФЗ, включая диабет тип 1 и тип 2, коронарную болезнь, бронхиальную астму, болезнь Крона, маниакально-депрессивный психоз и др. (см. разделы 1, 6.1, 6.3, 9).

7. Существенным продвижением в повышении эффективности, точности и стоимости тестирования мутаций явились разработки последних двух лет, направленные на совмещение несомненных преимуществ метода ПЦР в реальном времени с принципами биочиповой диагностики (рис. 4.17). Так, с помощью биочипа фирмы “Fluidigm” [www.fluidigm.com] можно одновременно анализировать мутации или тестировать SNP в 9216 локусах. Метод имеет большую специфичность и точность, чем метод полногеномного скрининга GWAS (см. раздел 4.6.). Себестоимость исследования одной мутации/полиморфизма не превышает 1 рубля.

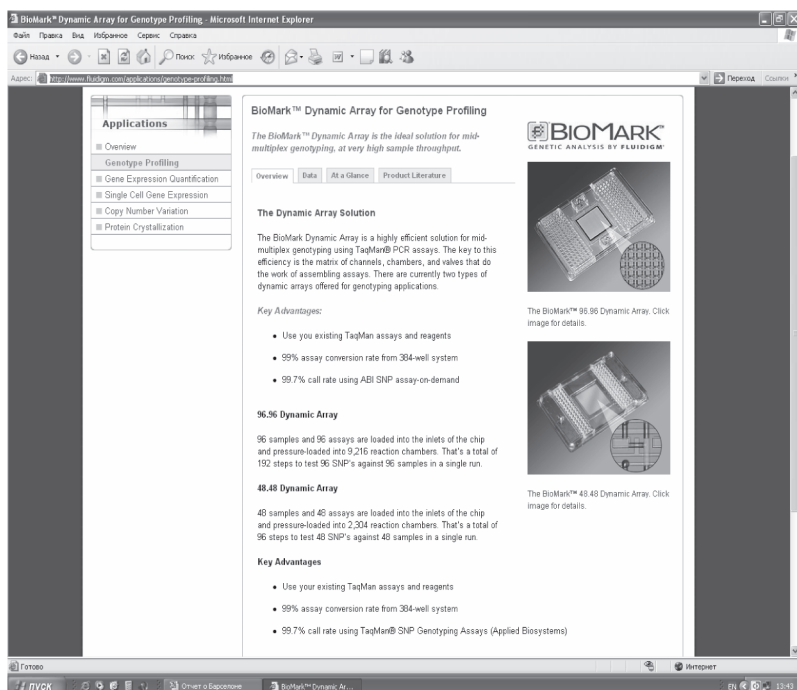
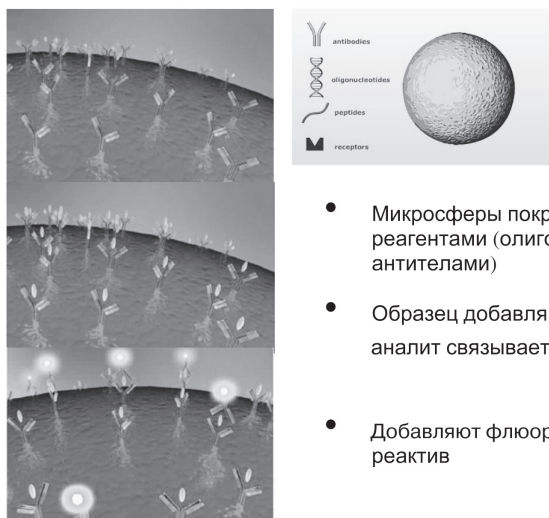


Рис. 4.17. Разработка фирмы “Fluidigm”, позволяющая проводить ПЦР в реальном времени на биочипах (пояснения в тексте)



Рис. 4.18. Оборудование, необходимое для масс-спектрометрического анализа (<http://biophysics.uoguelph.ca/central/facilities.htm>) (пояснения в тексте)



- Микросферы покрыты захватывающими реагентами (олигонуклеотидами или антителами)
- Образец добавляют к микросферам, аналит связывается с микросферами
- Добавляют флюоресцентномеченный реактив

Рис. 4.19. Гибридизация на микросферах (www.perkinelmer.com) (пояснения в тексте)

4.5. МЕТОД МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Метод масс-спектрометрии относится к тонким физическим методам и основан на измерении отношения массы заряженных частиц (ионов) к их заряду (рис. 4.18). В качестве матрицы, которая подвергается лазерному облучению (MALDI), выступают молекулы ДНК, в которых любые изменения (мутации, аллельные варианты) приводят к изменению массы. Метод достаточно трудоемок, требует высококвалифицированного персонала. В то же время метод обладает рядом несомненных преимуществ: позволяет проводить анализ большого числа ДНК-проб с высокой скоростью и производительностью.

4.6. СИСТЕМА, ОСНОВАННАЯ НА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ, ИЛИ X-MAP-ТЕХНОЛОГИЯ

Этот метод иногда называют методом «жидких биочипов» [www.perkinelmer.com]. Он основан на использовании микросфер, которые анализируют с помощью проточной цитометрии (рис. 4.19, 4.20). Микросферы покрыты захватывающими реагентами (олигонуклеотидами или антителами). При смешивании образца с микросферами происходит его гибридизация с пробами (аналогично гибридизационным био-

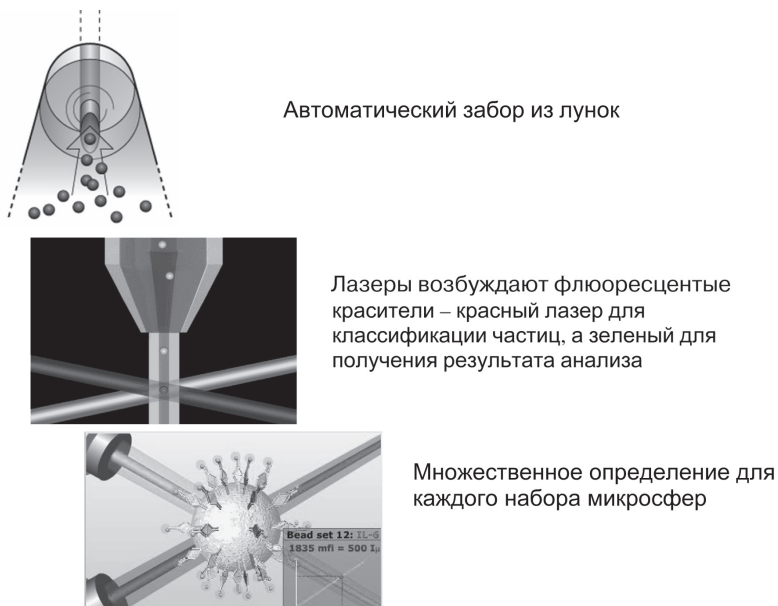


Рис. 4.20. Принцип детекции мутаций на микросферах (www.perkinelmer.com) (пояснения в тексте)

чипам) (рис. 4.19). Каждая микросфера имеет свой собственный «адрес», по которому она потом детектируется (рис. 4.20). И если гибридизация произошла, такая проба может быть выявлена для дальнейшего анализа благодаря детекции флюоресцентного сигнала с помощью луча лазера.

Система, основанная на проточной цитометрии, обладает рядом преимуществ: одномоментный анализ многих ДНК-проб, высокая производительность, низкая себестоимость реагентов, отсутствие фоновой зависимости (в отличие от биочипов). Это один из наиболее привлекательных методов генотипирования МФЗ в ближайшие десятилетия.

4.7. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАНОПОР

Секвенирование ДНК с помощью нанопор — совершенно новый подход, основанный на протягивании однонитевой молекулы ДНК через нанопору (рис. 4.21). При этом по степени открытия поры и величине электрического минисигнала, возникающего при прохождении через нее разных нуклеотидов, судят о их первичной последовательности [http://bio.fizteh.ru/index/NewsBiotech/dna_nanopory_10042006.html?&xsl:onlynew=1]. Хотя в

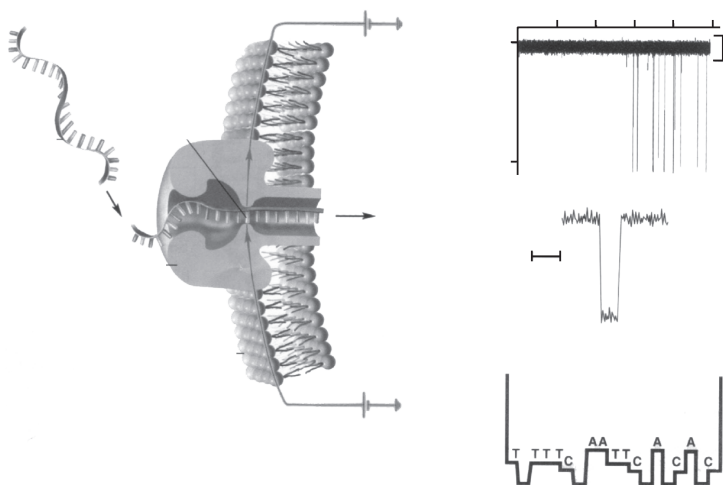


Рис. 4.21. Принцип секвенирования ДНК с помощью нанопор (пояснения в тексте)

настоящее время данный метод находится на стадии разработки, возможно, в ближайшем будущем именно он заменит традиционное секвенирование и позволит снизить стоимость секвенирования индивидуального генома с существующей сегодня величины в 10 млн долларов до 1 000 долларов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной главе приведены как основные, базовые методы ДНК-анализа, так и современные высокоэффективные полуавтоматические и автоматические методы генетического тестирования с целью идентификации мутаций и, главным образом, однонуклеотидных замен — SNP, которые особенно важны для выяснения генов и генетических локусов, ассоциированных с МФЗ. Благодаря этим методам уже достигнут решающий прогресс в секвенировании генома человека. Вполне реальной стала возможность получения карты целого генома конкретного человека (см. главу 8). Причем если сегодня стоимость расшифровки первичной нуклеотидной последовательности целого генома составляет около 10 млн долларов, то уже в ближайшие 4–5 лет, как предполагают, она снизится до 1 000 долларов! Нет сомнения, что уже в течение нескольких лет будет успешно завершен общегеномный поиск аллельных ассоциаций для всех основных МФЗ, что позволит резко увеличить предсказательную (предиктивную) ценность досимптоматического генетического тестирования наследственной предрасположенности (см. главы 8, 9).

**СПИСОК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ,
ДЛЯ КОТОРЫХ ПОКАЗАНА АССОЦИАЦИЯ
С МУЛЬТИФАКТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (МФЗ)
И НАРУШЕНИЯМИ
ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА**

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно не менее 1 500 генов, относящихся к различным генным сетям, для которых показана ассоциация с МФЗ человека. Многие из этих генов тестированы в различных диагностических и лабораторных центрах по молекулярной биологии РФ, в том числе и в лаборатории пренатальной диагностики НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН. Информация о других генах почерпнута, главным образом, из зарубежных источников. Большинство приведенных генов и их полиморфизм рассмотрены в специальных разделах данной монографии, посвященных той или иной мультифакторной патологии и суммированных в главе 6. Приведенный ниже каталог (табл. 5.1) содержит только краткую информацию о каждом гене, которая облегчает поиск и знакомство с функциональными особенностями аллельных вариантов гена, его ассоциацией с теми или иными МФЗ.

Таблица 5.1

Список генов-кандидатов, ассоциированных с некоторыми частями МФЗ

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Биотрансформация/biotransformation						
Фаза I/Phase I						
108330	CYP1A1	Цитохром P450 1A1	15q22-q24	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм полициклических ароматических углеводородов: бензопирен, нитрозамины	p, *2A, *2B, *4: C4887A, A4889G, T6235C	Рак легких (*2B, *2A), коло-ректальный рак (*2B, *2A), рак полости рта (*2B), рак молочной железы (*2B), почечно-клеточная карцинома (*2A, *2B, *4), острый лейкоз (*2A), острый лимфобластный лейкоз (*2A), В-клеточный хронический лимфолейкоз (*2A, *2B, *4)
124060	CYP1A2	Цитохром P450 1A2	15q22-qter	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм полициклических ароматических углеводородов, кофеина, диазепам, верапамила, метадона, теофиллина, эстрадиола	*1B: 1545T>C	Онкологические заболевания. Повышает риск возникновения инфаркта миокарда с каждой лишней выпитой чашкой кофе
122720	CYP2A6	Цитохром P450 2A6	19q13.2	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм никотина, кумарина, циклофосамида, ритонавира, парацетамола, вальпроевой кислоты	*2, *3, *4: Leu160His, конверсия, делеция	Снижение риска развития рака легкого (*4), снижение риска развития табачной зависимости (*2, *3), более успешное лечение табачной зависимости (*2)

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
601771	CYP1B1	Цитохром P450 1B1	2p22-p21	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм холестерина, стероидов и липидов	V432L	Онкозаболевания, гормональные нарушения. Глаукома
123930	CYP2B6	Цитохром P450 2B6	19q13.2	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм никотина, цитостатиков (циклофосамид), противовирусных препаратов (эфавиренца и невинипина), антидепрессантов (бупропиона), анастетиков (пропофола), синтетических опиоидов (метадона), эндогенных стероидов, вальпроевой кислоты	*2, *4, *5, *6: 64C>T (Arg22Cys); 785A>G (Lys262Arg); 1459C>T (Arg487Cys); 516G>T (Gln172His)	Затрудненное лечение табачной зависимости
124030	CYP2D6	Цитохром P450 2D6	22q13.1	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм β-адреноблокаторов, антидепрессантов, антипсихотропных веществ, антиаритмических, нейролептиков, противогипертензивных препаратов, ингибиторов монооксидредуктазы, производных морфина, нейротрансмиттеров (допаминов), анальгетиков, опиатов	*3, *4: Del 2637A, 1934 G>A	Рак легкого (быстрые метаболиты), плоскоклеточная карцинома полости рта (медленные метаболиты), рак простаты, острый лимфобластный лейкоз (медленные метаболиты), острый миелобластный лейкоз (медленные метаболиты), болезнь Паркинсона

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
601130	CYP2C9	Цитохром P450 2C9	10q24	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм ингибиторов ангиотензиновых рецепторов (лозартана и ирберсартана), антикоагулянтов (варфарина), сахароснижающих препаратов (глипизид), противосудорожных препаратов (фенитоина, диазепам), антидепрессантов (амитриптилина, кломипрамина, имипрамина), ингибиторов протонных помп (омепразола), нестероидных противовоспалительных препаратов (диклофенак, ибупрофен, пироксикам), толбутамида	*2, *3: 430 C>T, 1075 A>C	Рак легкого (аденокарцинома) (*2), колоректальный рак (*2), В-клеточный хронический лимфолейкоз (*2), глубокая депрессия (*3), эпилепсия
124020	CYP2C19	Цитохром P450 2C19	10q24.1-q24.3	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм противосудорожных препаратов, ингибиторов протонных помп (омепразол), прогестина, барбитуратов, рифампицина, симвастина	*2: 681G>A	Острый лейкоз

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
609300	<i>CYP17A1</i>	Цитохром P450 17A1	10q24.3	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, участие в метаболизме стероидных гормонов (прогестины, минералокортикоиды, глюкокортикоиды, андрогены и эстрогены)	rs1042386 rs743572	Онкологические заболевания. Позволяет прогнозировать риск развития опухолей преимущественно молочных желез
107910	<i>CYP19A1</i>	Ароматаза (цитохром P450 19)	15q21.1	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм ароматических групп эстрогенов и андрогенов	A1-A6: (TTTA)7-13	Онкологические заболевания эндометрия (A1, A6), рак молочной железы (A2/A2), рак простаты (A1/A1, A1/A2)
124040	<i>CYP2E1</i>	Цитохром P450 2E1	10q24.3-qter	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм этанола, ацетона, бензола, бензопирена, тетрахлористого углерода, канцерогенов табачного дыма	RsaI (-1019C>T); PstII (-1293G>C); DraI (-7668T>C); TagI (-9896C>G)	Гепатома печени, алкогольная болезнь печени 4, 7 — гепатома, индуцированная этанолом; 4, 5 — алкоголь-зависимые болезни печени; 1, 4 — опухоли (глиомы) (RsaI); колоректальный рак, рак желудка у курильщиков; рак груди у курильщиц, лимфома 2.1 — рак простаты
124010	<i>CYP3A4</i>	Цитохром P450 3A4	7q22.1	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм лекарственных препаратов, тестостерона, эстрогенов	* 1B 5' untranslated region — 392A>G	Мелкоклеточный рак легкого, особенно у курящих, лейкоemia, связанная с лечением эпидефило-токсиком, рак простаты

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
605325	<i>CYP3A5</i>	Цитохром P450 3A5	7q22.1	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, метаболизм нифедипина, циклоспорина, стероидных гормонов (тестостерона, прогестерона, андростендиона)	*3A: 6986 A>G	Пониженное кровяное давление, снижение риска развития гипертензии, снижение риска развития рака легкого
168820	<i>PON1</i>	Параоксиназа	7q21.3	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, инактивация фосфорорганических соединений, органофосфатов, карбаматов, эфиров уксусной кислоты, включая детоксикацию боевых отравляющих веществ (зарин, заман, табун)	Gln192Arg (584A>G); Leu55Met (172T>A)	ИБС, коронарная болезнь (Gln192Arg), болезнь Паркинсона, атеросклероз, церебральный инфаркт, кардиоваскулярные заболевания (Leu55Met)
103720	<i>ADH1B</i> (<i>ADH2</i>)	Алкогольдегидрогеназа	4q22	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, катаболизм этанола и других спиртов, окисление спиртов до альдегидов	*2: Arg47His, 141 G>A	Повышенная чувствительность к этанолу, протективное действие в отношении алкоголизма, понижение риска алкогольного цирроза печени, рака груди, пищевода, желудка
100650	<i>ALDH2</i>	Альдегиддегидрогеназа митохондриальная	12q24.2	Первая фаза детоксикации ксенобиотиков, катаболизм алкоголя, превращение токсичных альдегидов в карбоновые кислоты	*2: Glu487Lys (1510G>A)	Гепатоцеллюлярная карцинома, рак пищевода, глотки, ротовой полости, алкогольная болезнь, цирроз печени

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Фаза II/ Phase II						
612182	<i>NAT2</i>	Арилами- N-ацетил- трансфе- раза 2	8p23.1- p21.3	Вторая фаза детоксикации ксенобиотиков, N-ацетилирование, метаболизм противотуберкулезных препаратов (изониазид, р-анизид), антиаритмических препаратов (прокаинамид), амонифида, 2-аминофлуорена, токсических нитрозаминов в сигаретном дыме, оксидантов, пестицидов	*4 (wt) (T341C), C481T *5 G590A *6 G857A *7 S1, S2, S3 *5, *6, *7 — медлен- ные ацетили- торы	Рак легкого (медленные ацетилаторы, *5B/*6), плоскоклеточная карцинома легкого (медленные ацетилаторы, *5B/*6), рак молочной железы (медленные ацетилаторы, быстрые ацетилаторы, *6/*6), межтучные метаболизеры, *6/*6), рак мочевого пузыря (медленные ацетилаторы, *5B), колоректальный рак (быстрые ацетилаторы), множественная миелома (медленные ацетилаторы), острый лимфобластный лейкоз (медленные ацетилаторы, *5C, *7B), контактная аллергия (кожная) — чувствительность к паразамещенным ариламинам (быстрые ацетилаторы (*4)), атопические заболевания (медленные ацетилаторы (гомозиготы по *5, *6 и *7 аллелям))
187680	<i>TPMT</i>	Тиопу- ринметил- трансфе- раза	6p22.3	Вторая фаза детоксикации ксенобиотиков, S-метилирование, метаболизм цитостатиков (6-меркаптопурина, азатиоприна, 6-тиогуанина)	*3A, Ala154Thr *3B; Tyr240Cys *3C; *3D, Ala80Pro *2; *4, *5, *6, *7; Arg215His *8	Гемобластоз, тиопуриновая токсичность у детей с острым лимфобластным лейкозом при терапии 6-меркаптопурином

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
132810	<i>EPHX1</i>	Микросомальная эпоксидгидролаза	1q42.1	Вторая фаза детоксикации ксенобиотиков, водная конъюгация, метаболизм высокоактивных производных эпоксида	S, F: Ttg113His,337 T>C; His139Arg, 415 A>G	Хронический бронхит, эмфизема, обструктивная пневмония, гестоз (генотипы S/S, S/N), рак легких, рак яичников
600436	<i>GSTT1</i>	Глюта-тион-S-трансфераза T1	22q11.2	Вторая фаза детоксикации ксенобиотиков, глютагтон опосредованное связывание электрофильных соединений, играет важную роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению жиров, свободным радикалам, алкилированию белков	0/0	Рак легкого, рак мочевого пузыря, множественная миелома, рак молочной железы, неходжкинская лимфома, острый миелобластный лейкоз, бронхиальная астма, эпителиальный рак яичников, эндометриоз
138350	<i>GSTM1</i>	Глюта-тион-S-трансфераза M1	1p13.3	Вторая фаза детоксикации ксенобиотиков, глютагтон опосредованное связывание электрофильных соединений, играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению жиров, свободным радикалам, алкилированию белков, в предотвращении повреждения ДНК	0/0	Рак легкого, рак молочной железы, плоскоклеточная карцинома легкого, Т-клеточная неходжкинская лимфома, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак яичников, эндометриоз, эндометриодный рак яичников, эндометриодный/светлоклеточный рак яичников, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический бронхит, алкогольный цирроз, бронхиальная астма

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
134660	<i>GSTP1</i>	Глюта- тион-S- трансфе- раза P	11q13	Вторая фаза детоксикации ксенобиотиков, глотатин опосредованное связывание гидрофобных и электрофильных соединений, играет важную роль в детоксикации пестицидов и в процессах канцерогенеза	*B, *C: Ple105Val (313A>G); Ala114Val (341C>T)	Рак легкого, кишечника, яичников, семенников, мочевого пузыря, почечек, гортани, кожи, привычное невынашивание, спонтанные аборт
Фаза III/Phase III						
171050	<i>MDR1</i>	Гликопротеин P 1	7q21.1	Третья фаза детоксикации ксенобиотиков, АТФ-зависимое выведение ксенобиотиков, субстратами являются сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, макролиды, цитостатики, противовирусные препараты	3435C>T	Эффективность и безопасность лекарственной терапии
Липидный обмен/lipid metabolism						
107680	<i>APOA1</i>	Аполипо- протеин A1	11q23-q24	Метаболизм липопротеинов, главный компонент липопротеинов высокой плотности	-75G>A +83C>T, +93C>T	Сердечно-сосудистые заболевания, гипертриглицеридемия, ненейропатические амилоидозы

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
107690	<i>APOA-IV</i>	Аполипопротеин A4	11q23	Метаболизм липопротеинов, ингибирует окисление липопротеинов низкой плотности	127A>G Thr347Ser	Сердечно-сосудистые заболевания, гипертриглицеридемия
606368	<i>APOA5</i>	Аполипопротеин A5	11q23	Метаболизм липопротеинов, важнейший фактор регуляции уровня триглицеридов	+553G>T -1131 T/C -3 A>G +56 C>G Ser19Trp	Главный фактор риска коронарной болезни сердца, метаболический синдром (Ser19Trp)
107730	<i>APOB</i>	Аполипопротеин В	2p24-p23	Гомеостаз холестерина	3' APOB- VNTR C7623T G12619A	Сердечно-сосудистые заболевания, гиперхолестеринемия
107720	<i>ApoCIII</i>	Аполипопротеин C3	11q23.1-q23.2	Катаболизм триглицеридов. Ингибирует липопротеинлипазу и печеночную липазу	-2854 G/T -482C>T 3175C>G 3206G>T 3238C>G (SstI) C5163G	ИНСД, аллель <i>5163G</i> (<i>S2</i>) ассоциирован с развитием ишемической болезни сердца, атеросклерозом и тромбозами. Аллель <i>S2</i> приводит к гипертриглицеридемии в результате торможения активности липопротеиной липазы
107741	<i>APOE</i>	Аполипопротеин E	19q13.2	Метаболизм липопротеинов	Cys112Arg, Arg158Cys (E2, E3, E4)	Аллели <i>E2</i> , <i>E4</i> ассоциированы с гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией. Показана ассоциация аллеля <i>E4</i> с атеросклерозом, семейной гиперлипотеинемией III типа, ИБС, болезнью Альцгеймера

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
163729	<i>NOS3</i>	Эндотелиальная синтаза оксида азота	7q36	Катализирует реакцию образования окиси азота (NO) из L-аргинина, участвует в торможении работы сократительного аппарата сосудов гладкомышечных элементов и в синтезе NO в эндотелии и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления	4a/4b (4/5) Glu298Asp	Алели 4 (4a) и Asp298 (T894) ассоциированы с рядом сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, инфаркт миокарда, диабетическая нефропатия при сахарном диабете, атеросклероз и др.). Аллель 4b является генетическим маркером тяжелой формы чистого гестоза
163731	<i>NOS1</i>	Нейрональная синтаза оксида азота	12q24.2-q24.31	Катализирует реакцию образования окиси азота (NO) из L-аргинина, в качестве нейротрансмиттера	G-84A exon 1c AAT-повторы в 20-м интроне	Число AAT-повторов в 20-м интроне гена достоверно связано с количеством оксида азота (NO) в выдыхаемом воздухе и наличие <12 AAT-повторов является фактором риска развития астмы
118470	<i>CETP</i>	Переносчик эфира холестерина	16q21	Метаболизм липопротеинов	I405V	Атеросклероз
192240	<i>VEGFA</i>	Сосудистый эндотелиальный фактор роста A	6p21-p12	Индукцирует ангиогенез, васкулогенез, стимулирует рост клеток эндотелия и их миграцию, ингибирует апоптоз	-634 G>C -2578 C>A 1154G>A	Сердечно-сосудистые заболевания, инсулиннезависимый сахарный диабет, болезнь Альцгеймера, диабетическая ретинопатия

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Коагуляция и клеточная адгезия/coagulation						
227400	<i>F5</i>	Коагуляционный фактор V	1q23	Кофактор, входит в состав протромбиназного комплекса (F10a + F5a + Ca ²⁺ + фосфолипиды), который осуществляет превращение протромбина в тромбин	1691G>A (Arg506Gln), мутация Лейден	Венозный тромбоз, тромбоз глубоких и поверхностных вен, мозговых вен, портальной вены, синдром Бадда-Киари, артериальный тромбоз, ретикулярный тромбоз, тромбозомелия, ИМ, ИИ, гестоз, преэклампсия, СПП, антенатальная гибель плода, ПОНРП, HELLP-синдром, ФПН
176930	<i>F2</i>	Коагуляционный фактор 2/ протромбин	11p11-q12	Предшественник тромбина	20210 G>A в 3'-концевой некодирующей части гена	Венозный тромбоз, тромбоз периферических вен, мозговых вен, портальной вены, артериальный тромбоз, тромбозомелия ТЭЛА, ИИ, ИБС, ИМ, нейросенсорная глухота, гестоз, ПОНРП, невынашивание беременности на ранних сроках, СЗВРП, ФПН
134830	<i>FGB</i>	β-фибриноген	4q28	Входит в состав фибриногена, который под действием тромбина превращается в нерастворимый белок фибрин, обеспечивая свертывание крови	G>A в -455 положении промоторной области гена	Артериальный тромбоз, тромбозомелия, инсульт, ГБ, гестоз
227500	<i>F7</i>	Коагуляционный фактор VII	13q34	После взаимодействия с тканевым фактором F7 активирует F9 и F10, запуская каскад коагуляции	10976G>A (Arg353Gln)	Атеросклероз, тромбозомелия, ИМ, ГБ, СЗВРП, гипотрофия плода, ФПН

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
173360	<i>PAI1</i>	Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа	7q21.3–22	Инактивация тканевого активатора плазминогена	5G>4G в –675 положении промоторной области гена	Венозный тромбоз, тромбоз глубоких вен, артериальный тромбоз, тромбоэмболия, ИБС, ИМ, гестоз, бесплодие, ранние преембрионические и эмбрионические потери, неудачи ЭКО
173370	<i>PLAT</i>	Тканевый активатор плазминогена	8p12	Активатор плазминогена, катализирует превращение плазминогена в плазмин, запуск фибринолиза	I/D полиморфизм	ИМ, инсульт
173470	<i>ITGB3 (GP3a)</i>	Репепторный гликопротеин IIIa (GPIIa)	17q21.32	В комплексе с GPIIb образует на поверхности тромбоцита рецептор для фибриногена, обеспечивая взаимодействие тромбоцита с фибриногеном и агрегацию тромбоцитов	1565T>C (Leu33Pro), PLA1/PLA2	Венозный и артериальный тромбозы, ИБС, синдром внезапной смерти, ИМ, аутизм, гестоз, СЗВРП
192974	<i>ITGA2 (GPIa)</i>	Рецепторный гликопротеин Ia (GPIa)	5q23-q21	В комплексе с GPIIb формирует рецептор для коллагена, обеспечивая адгезию тромбоцитов к субэндотелию	807C>T	Артериальный тромбоз, ИМ в молодом возрасте, ИИ, ФПН
123260	<i>CRP</i>	C-реактивный белок	1q21-q23	Воспаление (острая фаза), узнает патогены и разрушает их элиминацию	–1059G/C rs3091244	Сердечно-сосудистые заболевания

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Ангиотензин-рениновая система/Angiotensin-renin system						
179820	<i>REN</i>	Ренин	1q32	Превращение ангиотензиногена в ангиотензин 1-го типа	Met235Thr (704T>C)	Артериальная гипертензия
106150	<i>AGT</i>	Ангиотензиноген	1q42-q43	Предшественник ангиотензина. Субстрат для ренина	Met235Thr	Артериальная гипертензия, ИБС, атеросклероз и ИМ
106165	<i>AGTR1</i>	Рецептор 1-го типа к ангиотензину II	3q21-q25	Связывает ангиотензин II. Опосредует вазоконстрикторную функцию: стимуляция синтеза и секреции альдостерона, канальцевая реабсорбция ионов натрия, снижение почечного кровотока, пролиферация ГМК, гипертрофия сердечной мышцы, стимуляция высвобождения вазопрессина и торможение образования ренина	1166A>C	Артериальная гипертензия, ИБС, атеросклероз и ИМ
300034	<i>AGTR2</i>	Рецептор 2 типа к ангиотензину II	Xq22-q23	Связывает ангиотензин II. Опосредует вазодилаторную функцию: натрийуретическое действие, высвобождение NO и простациклина, антипролиферативное действие	3123G>A	Артериальная гипертензия

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
113503	<i>BDKRB2</i>	Рецептор 2-го типа к брадикинину	14q32.1–32.2	Связывает брадикинин. Результатом активации эндотелиальных B2 рецепторов является вазорелаксация, эффект которой опосредуется стимуляцией эндотелиальной NO-синтазы и последующей генерацией NO. B2 рецепторы на ГМК и кардиомиоцитах опосредуют сократительный и инотропный эффекты соответственно. Активация B2 рецепторов ассоциирована с антигипертрофическим и/или антипролиферативным эффектами в кардиомиоцитах и фибробластах	–58T>C, I>D	Артериальная гипертензия, ИБС, атеросклероз и ИМ
Метаболизм гомоцистеина/homocysteine metabolism						
607093	<i>MTHFR</i>	Метилентетрагидрофолатредуктаза	1p36.3	Конверсия гомоцистеина в метионин	677C>T	Венозный и артериальный тромбозы, ТЭЛА, синдром Багда-Киари, ГБ, ИИ, ИБС, ИМ, шизофрения, дефект зарощения невральной трубки (spina bifida и анэнцефалия), гестоз, преэклампсия, ПОНРП, СПП, СЗВРП, антенатальная гибель плода, увеличение толщины внутренней и средней (интимы) сосудистой оболочки и бессимптомный атеросклероз сонной артерии

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
602568	<i>MTRR</i>	5-метилтетрагидрофолат-глютаминометилен-тетрагидрофолат-глютаминометилтрансфераза	5p15.3-p15.2	Синтез метионина	66A>G 726delTTG Gly487Arg	Гипоцистонурия, дефект зародышевой трубки (spina bifida и анэнцефалия), ИБС
Метаболизм адреналина/adrenalin metabolism						
109630	<i>ADRB1</i>	Адренорецептор B1	10q24-q26	Активирует аденилатциклазу через G-белок	R389G	Артериальная гипертония, эффективность терапии бронхальной астмы, метаболический синдром
109690	<i>ADRB2</i>	Адренорецептор B2	5q32-q34	Активирует аденилатциклазу через G-белок	48 A>G, 81 C>G	Артериальная гипертония, эффективность терапии бронхальной астмы
Метаболизм костной ткани						
601769	<i>VDR</i>	Рецептор витамина D	12q12-14	Рецептор к витамину D, участвует в метаболизме кальция в организме человека	FokI (2 экзон 2T>C), TaqI (9 экзон 352T>C), ApaI (A>C), 3731A/G	Остеопороз, сахарный диабет 1-го типа (foci, араi, таqI полиморфизм — f, a, t аллели)
120150	<i>COL1A1</i>	Коллаген I типа α1	17q21.31-q22	Фибриллярный белок, основной компонент соединительной ткани, обеспечивающий ее прочность, входит в состав костей, сухожилий, связок, кожи и др.	-1997 G/T 1245 G/T	Остеопороз

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
112260	<i>BGP</i>	Остеокальцин	1q25-31	Основной неколлагеновый белок костной ткани, витамин К-зависимый, ответственный за минерализацию кости, связывает кальций и гидроксипапатит, определяет связывание остеокластов с костью и тем самым является негативным регулятором костного формирования	-198C/T	Остеопороз
133430	<i>ESR1</i> (<i>ER-α</i>)	Рецептор эстрогена 1	6q25.1	Рецептор эстрогена 1	A/G, C/T	Остеопороз
138040	<i>GCCR</i> (<i>GR</i>)	Глюкокортикоидный рецептор	5q31	Глюкокортикоидный рецептор	N363S A/G	Остеопороз
114131	<i>CALCR</i>	Рецептор кальцитонина	7q21.3	Рецептор к кальцитонину, пептидному гормону, участвующему в регуляции фосфорно-кальциевого обмена, а также баланса активности остеокластов и остеобластов	463C>T	Остеопороз
Главный локус гистосовместимости						
146880	<i>HLA-DQA1</i>	Антиген главного комплекса гистосовместимости II класса DQ альфа 1	6p21.3	Участствует в связывании и экспонировании на поверхности макрофагов процессированных (связанных) фрагментов различных антигенов	*301, *501 (2 экзон)	Инсулинзависимый сахарный диабет, аутоиммунные заболевания

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
604305	<i>HLA-DQB1</i>	Антиген главного комплекса гистосовместимости II класса DQ бета 1	6p21.3	Участствует в связывании и экспонировании на поверхности макрофагов процессированных (связанных) фрагментов различных антигенов	*201 *302 (2 экзон)	Инсулинзависимый сахарный диабет, инсулиннезависимый сахарный диабет, аутоиммунные заболевания. Особо неблагоприятный исход (т. е. манифестация сахарного диабета 1-го типа) наблюдается при следующих сочетаниях генов <i>DQA1</i> и <i>DQB1</i> : <i>DQA1 301 DQB1 302</i> и <i>DQA1 201 DQB1 501</i>
600169	<i>MICA</i>	Антиген главного комплекса гистосовместимости I класса	6p21.33	Экспрессируется на клеточной поверхности, является стресс-индуцированным антигеном	*5 *5.1 (GCT 5 экзон)	Аллель 5 predisполагает к развитию сахарного диабета 1-го типа в раннем возрасте (до 14 лет), а аллель 5.1 является фактором риска развития заболевания в более позднем возрасте (после 30 лет). Особо неблагоприятный исход наблюдается при сочетании этих аллелей с аллелью гена <i>DQB1 201</i>
123890	<i>CTLA4</i>	T-лимфоцит-ассоциированная серинэстераза 4	2q33	Передача сигнала T-клеткам	A49G	Замена в 49 положении гена A (норма) на G (мутация) ассоциирована с развитием аутоиммунных заболеваний: нарушениями щитовидной железы (болезнь Грейвса, болезнь Эддисона, тиреоидит Хашимото, аутоиммунный гипотиреозидит), инсулинзависимым сахарным диабетом, ревматоидным артритом и др.

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Воспаление и иммунный ответ						
147680	<i>IL2</i>	Интерлейкин-2	4q26-q27	Участует в пролиферации Т- и В-лимфоцитов	330T>G -384 T>G rs17388568	Инсулинозависимый сахарный диабет, целиакия, рак простаты
147780	<i>IL4</i>	Интерлейкин-4	5q31.1	Плейотропный цитокин, активация Т клеток	-590C>T	Астма и атопические заболевания
147781	<i>IL4R</i>	Альфа-цепь рецептора интерлейкина 4	16p12.1-p11.2	Трансмембранный белок, связывающий интерлейкин-4 и 13, регулирует IgE продукцию и запускает дифференциацию Т-хелперов 2	Gln551Arg	Астма, атопические заболевания, ренины и экзема.
147620	<i>IL6</i>	Интерлейкин-6	7p21	Плейотропный цитокин, координирующий иммунный и острофазный воспалительный ответы, а также онкогенез и гемопоэз	-174C/T	Иммунные нарушения, остеопороз, ССЗ
124092	<i>IL10</i>	Интерлейкин-10	1q31-q32	Антивоспалительный цитокин	-592C>A -1082A>G -2849A>G -3575T>A	Иммунные нарушения, ревматоидный артрит, псориаз, предрасположенность к заражению вирусом иммунодефицита 1-го типа

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
191160	<i>TNFA</i>	Фактор некроза опухоли альфа	6p21.3	Разрушение опухолей, иммунный ответ. Провоспалительный цитокин, играет важную роль в регуляции нормальной дифференцировки, роста и метаболизма различных клеток	-308G>A -238G>A	Сахарный диабет 2-го типа (-238A/G, -308 G/A), бронхиальная астма (-308 G/A), остеопороз, иммунные нарушения
190180	<i>TGFB1</i>	Трансформирующий фактор роста бета 1	19q13.1	Воспаление и регуляция иммунного ответа, контроль пролиферации, дифференциации многих типов клеток	-509C>T T29C G915C	Сахарный диабет, атеросклероз, нефропатия, ожирение, болезни легких, муковисцидоз, канцерогенез, сердечный фиброзис
147570	<i>IFNG</i>	Интерферон гамма	12q14	Воспаление и регуляция иммунного ответа, защита организма от вирусных и бактериальных инфекций	-179G>T -764C>G +874T>A CA VNDR 1349	Острый иммунодефицитный синдром, устойчивость к вирусу гепатита С, сахарный диабет, атеросклероз, чувствительность к туберкулезу
603030	<i>TLR4</i>	Трансмембранный Toll-подобный рецептор 4	9q32-q33	Сигнальный рецептор воспаления, главная роль в узнавании патогена и активации внутреннего иммунитета	Asp299Gly	Врожденный иммунный дефицит, гиперчувствительность к эндотоксинам, рак кишечника
Рецепторы/Receptors						
601373	<i>CCR5</i>	Трансмембранный белковый рецептор	3p21.31	Служит основным входом для первичных штаммов ВИЧ-1, инфицирующих в первую очередь макрофаги и моноциты	Del32	Гомозиготы <i>del/del CCR5</i> обнаруживают почти полную устойчивость к ВИЧ-1 инфекции. У гетерозигот заболевание прогрессирует медленнее, чем у гомозигот <i>CCR5</i> +/-

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
313700	<i>AR</i>	Рецептор андрогена	Xq11.2-q12	Метаболизм стероидных гормонов	(CAG)(6-40)	Рак простаты, рак молочной железы
126450	<i>DRD2</i>	Рецептор дофамина D2	11q23	Медиатор нервной системы, участвует в передаче возбуждающих импульсов, ингибирует активность аденинциклазы	rs1800497	Формирование алкогольной и наркотической зависимости. Наличие аллеля A1 ассоциировано с предрасположенностью к алкоголизму
182135	<i>HTR2A</i>	Рецептор серотонина 2A	13q14-q21	Передача сигнала серотонина	102T>C -1438G>A rs7997012	Ожирение, нейropsychические заболевания, депрессия
192020	<i>SCGB1A1</i>	Секретоглобин 1 семейства 1A	11q12.3-q13.1	Ответственен за синтез секреторными клетками бронхов белка, который является основным (более 7%) компонентом бронхиальной жидкости	A38G	Мутация в 38 положении G на A приводит к снижению количества белка и увеличению риска бронхиальной астмы у гомозигот A/A в 8 раз и гетерозигот A/G в 4 раза.
603372	<i>TSHR</i>	Рецептор тиреостимулирующего гормона (тиреотропина)	14q31	Ответственен за изменение активности тиреоидного гормона	D727E N372T Asp727Glu	Замена аспарагина (D) на глутамин (E) в 727 колоне рецептора тиреотропина ассоциирована с развитием гипертиреоидных заболеваний. Инсулинорезистентность

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Контроль клеточного цикла						
164850	<i>MYCL1</i>	Онкоген <i>LMYC</i>	1p34.2	Транскрипционный фактор, влияющий на клеточную пролиферацию	T/G (L/S)	Аллель S, ассоциирован с повышенным риском некоторых типов опухолей и плохим прогнозом при наличии уже диагностированной опухоли, в случае рака легких генотип S/S ассоциирован с метастазами лимфатических узлов
191170	<i>TP53</i>	Онкоген <i>p53</i>	17p13.1	Контроль деления клетки, ДНК-репарация, апоптоз	G13494A, ins16del, Pro72 Arg	Рак, апоптоз, диабетическая полинейропатия (72Pro)
147460	<i>SOD2</i>	Супероксиддисмутаза 2 митохондриальная	6q25.3	Связывание активных форм кислорода, апоптоз	Ala16Val 401T>C	Идиопатическая кардиомиопатия, преждевременное старение, онкологические заболевания, диабетическая нефропатия
Онкомаркеры						
113705	<i>BRCA1</i> (опухолевый супрессор)	BRCA1 протеин	17q21	Ядерный белок, участвует в таких клеточных процессах, как репарация ДНК, регуляция транскрипции, клеточный цикл, апоптоз	185delAG, 300T>G, 4153delA, 5382insC	Рак молочной железы, яичников, желудка, толстой кишки

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
600185	<i>BRCA2</i> (опухоль левый супрессор)	BRCA2 протеин	13q12.3	Ядерный белок, участвует в регуляции репарации ДНК, транскрипции и в регуляции клеточного цикла	695insT, 6174delT	Рак молочной железы, яичников, желудка, толстой кишки
604373	<i>CHEK2</i>	Чекпойнт-киназа 2-го типа	22q12.1	Киназа, в ответ на повреждение ДНК вызывает остановку клеточного цикла, инактивирует белки семейства Cdc25, активирует p53 и BRCA1 белки и активизирует системы репарации ДНК	1100delC	Рак молочной железы, рак предстательной железы
Метаболизм углеводов						
604517	<i>PPARGC1A</i>	Альфа-ко-активатор-1 гамма-рецептора, активизируемого пролифераторами пероксисом	4p15.1	Коактиватор многих ядерных рецепторов (транскрипционных факторов), таких как PPARGα, PPARGγ, α- и β-рецепторов эстрогена и минералокортикоидов	Gly482Ser	482Ser аллель ассоциирован с повышенным риском развития ожирения, сахарного диабета 2-го типа, со сниженным показателем максимального потребления кислорода и низкой физической работоспособностью. Этот же аллель снижает риск развития артериальной гипертензии (обмен минералокортикоидов)

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
608886	<i>PPARGC1B</i>	Бета-коактиватор-1 гамма-рецептора, активированного пролифераторами пероксисом	5q33.1	Коактиватор многих ядерных рецепторов (транскрипционных факторов), таких как PPAR α , PPAR γ , α - и β -рецепторов эстрогена и минералокортикоидов	Ala203Pro	Ожирение
113730	<i>UCP1</i>	Разобщающий белок 1	4q28-q31	Переносчик анионов и протонов через митохондриальную мембрану	-3826A>G	Ожирение, нарушение термогенеза
601693	<i>UCP2</i>	Разобщающий белок 2	11q13	Играет одну из ключевых ролей в терморегуляции, связан с процессами аккумуляции жиров и рассеиванием энергии в виде тепла	Ala55Val -866G>A	Val аллель ассоциирован с повышенным риском развития сахарного диабета 2-го типа и ожирением
602044	<i>UCP3</i>	Разобщающий белок 3	11q13	Терморегуляция, участвует в процессах митохондриального биогенеза	-55C>T 304G>A 427C>T	Атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа и ожирение

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
600409	<i>PPARD</i>	Ген рецептора D, активизируемый пролифераторами пероксисом	6p21.1- p21.2	Выполняет функции по регуляции генов, вовлеченных в окисление ЖК и обмен холестерина	T294C	Ожирение, дислипидемия, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца
601487	<i>PPARG</i>	Ген рецептора G, активизируемый пролифераторами пероксисом	3p25	Функции этого транскрипционного фактора заключаются в регуляции генов, связанных с аккумуляцией жира (синтез триглицеридов), дифференцировкой адипоцитов и миобластов, чувствительностью к инсулину, активностью остеобластов и остеокластов (регуляция роста)	Pro12Ala	Сахарный диабет 2-го типа, ожирение, дислипидемия, артериальная гипертензия
170998	<i>PPARA</i>	Ген рецептора A, активизируемый пролифераторами пероксисом	22q13.31	Регуляция обмена липидов, глюкозы и энергетического гомеостаза, а также веса тела и воспалительного процесса посредством контроля экспрессии генов, вовлеченных в пероксисомальное и митохондриальное окисление, транспорт ЖК, синтез липопroteинов, катаболизм триглицеридов и обмен факторов воспаления	G2528C	Патологическая и физиологическая гипертрофия миокарда, сахарный диабет 2-го типа, ожирение, дислипидемия, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца

Таблица 5.1 (продолжение)

№ ОМIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
Гены сигнала инсулина						
147440	<i>IGF1</i>	Инсулиноподобный фактор I (соматомедин C)	12q22-q23	Передача «сигнала инсулина», влияет на рост, размножение и гибель β -клеток	CA повторы (промотор)	Сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, сердечная недостаточность, ИНСД, ВМД (с низкой минеральной плотностью костей)
147370	<i>IGF1R</i>	Рецептор инсулиноподобного фактора роста	15q26.3	Передача «сигнала инсулина»	Arg108Gln 3174G>A 2293G>A 1013G>A	Сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, ретинопатия
176730	<i>INS</i>	Инсулин	11p15.5	Метаболизм глюкозы	VNTR (5-prime untranslated region)	Сахарный диабет 1-го типа
Другие						
116790	<i>COMT</i>	Катехоло-О-метилтрансфераза (COMT)	22q11.2	Катехоламины осуществляют синаптическую передачу нервного импульса в центральной и вегетативной нервной системах (являются нейромедиаторами)	V158M Ala72Ser	Психические заболевания, болезнь Паркинсона, главный ген в патогенезе гестоза
604824	<i>KL</i>	Клото	13q12	Энергетический обмен, внутриклеточный сигналинг	-395 G>A 578A>G 1818 C>T	Остеопения, атеросклероз, хроническая почечная недостаточность

Таблица 5.1 (продолжение)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
604479	<i>SIRT1</i>	Сиртуин 1	10q21.3	Деацетилирование белков, регуляция генов семейства <i>FOXO</i>	rs7069102 rs3758391	Воспаление, сопровождающее артриты и артрозы, астма, сердечно-сосудистые патологии, нейродегенеративные расстройства, ожирение, когнитивная функция
604481	<i>SIRT3</i>	Сиртуин 3	11p15.5	Энергетический обмен	477G>T VNTR 72-bp repeat core in intron 5	Нарушение обмена веществ
176887	<i>PTPN2</i>	Протеин-тирозин фосфатаза, не-рецептор 2	18p11.3-p11.2	Осуществляет дефосфорилирование фактора STAT1, одного из главных регуляторов передачи сигналов иммунного ответа, в том числе и в системе регуляции синтеза интерлейкина 2	rs2542151	Сахарный диабет 1-го типа
600716	<i>PTPN22</i>	Протеин-тирозин фосфатаза, не-рецептор 22	1p13.3-p13.1	Осуществляет дефосфорилирование белков, передающих сигнал от антигенных рецепторов Т-клеток и рецепторов цитокинов	C1858T	Сахарный диабет 1-го типа, ревматоидный артрит, красная волчанка
120353	<i>MMP1</i>	Матриксная металлопротеаза 1 (калогеназа)	11q22.3	Контроль эмбрионального развития, репродукции и ремоделирования тканей	-1607G>GG	Хронический периодонтит, рак легкого, повышение риска метастазирования в лимфоузлы у пациентов с РМЖ и генотипом 2G/2G

Таблица 5.1 (окончание)

№ OMIM	Обозначение гена	Название продукта	Локализация гена	Функция	Основной полиморфизм	Ассоциации с болезнями
102574	<i>ACTN3</i>	α -актинин-3	11q13-q14	Продукт <i>ACTN3</i> является основным компонентом Z-линий мышечных сарком, а также определяет развитие быстрых мышечных волокон II типа	R577X (1747 C>T)	Определяет преобладающий тип поперечно-полосатых мышечных волокон, предрасположенность к скоростно-силовым видам спорта
601302	<i>PPP3R1</i> (<i>CNBI</i>)	Кальцеврин	2p16-p15	Продукт синтеза данного гена входит в состав регуляторной субъединицы Ca^{2+} -модулинфосфатазы, являющейся одним из основных регуляторов концентрации ионов Ca в организме	51/5D	Левожелудочковая гипертрофия сердца
102770	<i>AMPD1</i>	Аденозинмонофосфат дезаминаза	1p13.1	Продуктом синтеза является специфическая скелетно-мышечная аденозинмонофосфат дезаминаза (М-изоформа), участвующая в процессах азотистого обмена	C34T	Левожелудочковая гипертрофия сердца

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дополнительная информация об этих и других генах-кандидатах МФЗ можно найти в наших предыдущих монографиях и обзорах [30, 34], в соответствующих разделах данной монографии, а также в монографиях и обзорах академика В. П. Пузырева и сотрудников [62, 169, 170], профессоров Э. К. Хуснутдиновой, В. В. Носикова [148], в проспектах отечественных и зарубежных центров и фирм, уже осуществляющих различные варианты предиктивного генетического тестирования. Гены — маркеры различных МФЗ, идентифицированные методом GWAS с достоверностью $p < 10^{-6}$ указаны на сайте <http://www.genome.gov/GWASTudies/index.cfm?#searchForm>.

БОЛЕЗНИ И ГЕНЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

6.1. БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА

Введение

Бронхиальная астма (БА) — хроническое заболевание дыхательных путей с участием клеток (тучных, эозинофилов, Т-лимфоцитов), медиаторов аллергии и воспаления, сопровождающееся гиперреактивностью и вариабельной обструкцией бронхов. Клинически БА проявляется приступами удушья, появлением хрипов, кашля, затруднением дыхания, особенно ночью и/или ранним утром.

Среди взрослого населения БА встречается с частотой около 5 %, а у детей она регистрируется почти вдвое чаще [27, 207].

Характерны для БА два клинических фенотипа: гиперреактивность дыхательных путей и атопия. Своевременная профилактика и ранняя диагностика этих состояний являются актуальной проблемой современной пульмонологии.

Наследственная предрасположенность рассматривается как решающий фактор патогенеза БА. Это подтверждается многочисленными генетико-эпидемиологическими, семейными и близнецовыми исследованиями [423, 512, 728]. Так, при наличии БА у одного из родителей, риск БА у их ребенка в три раза выше по сравнению со здоровыми семьями и в шесть раз выше, если оба родителя больны БА.

Факторы, определяющие развитие БА, отличаются многообразием и подразделяются на 2 большие группы — генетические и средовые. Их взаимодействие определяет начало манифестации болезни и осо-

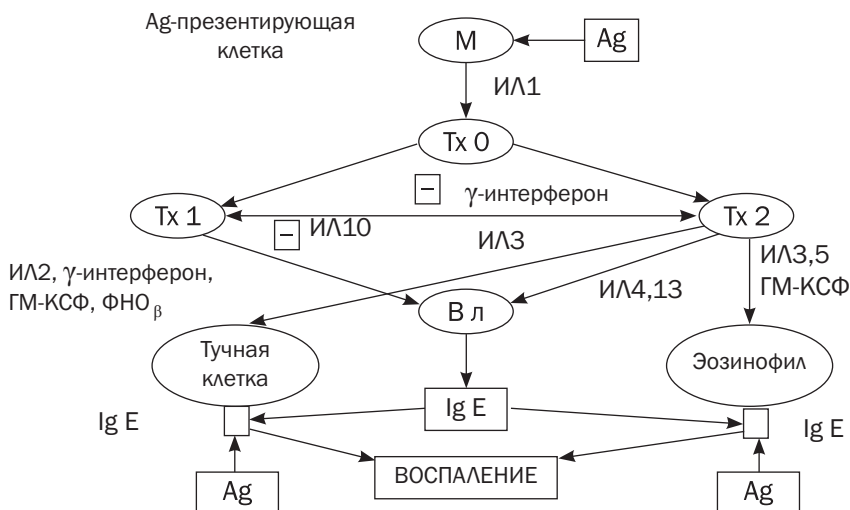


Рис. 6.1.1. Принципиальная схема воспалительной реакции типа I

Условные обозначения: Ag — антиген, М — макрофаг, Тх — Т-лимфоциты-хелперы, ИЛ — интерлейкин, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ФНО — фактор некроза опухоли, Вл — В-лимфоцит, IgE — иммуноглобулин E, — — тормозящее влияние

бенности ее клинического проявления [263, 333, 599]. Следовательно, БА является примером типичной мультифакториальной патологии с выраженной наследственной предрасположенностью [60, 207].

6.1.1. Современные представления о патогенезе бронхиальной астмы

Известно, что воспаление бронхов при БА и их обструкция в значительной мере определяются иммунными реакциями I, III и IV типов [207]. Ведущая роль в развитии механизмов гиперчувствительности I (анафилактического) типа принадлежит иммуноглобулинам IgE и G4 (рис. 6.1.1).

В патогенезе аллергической БА принято выделять 4 последовательные фазы: иммунологическую, патохимическую, патофизиологическую и условно-рефлекторную. Во время первой — **иммунологической** фазы, под влиянием аллергена В-лимфоциты секретируют специфические антитела, преимущественно IgE. Поступивший в дыхательные пути аллерген захватывается макрофагами, расщепляется на фрагменты, связывается с

гликопротеидами II класса комплекса гистосовместимости и транспортируется к поверхности макрофага. Далее активизируется субпопуляция Т-хелперов (Th2), которая продуцирует ряд цитокинов, участвующих в аллергической реакции I типа. Это приводит к активации и синтезу В-лимфоцитами IgE и IgG4, активации и дифференциации тучных клеток и эозинофилов IgE и IgG4, фиксируются клеточными Fc-рецепторами на поверхности клеток-мишеней аллергии I (тучные клетки, базофилы) и II порядка (эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги, тромбоциты). Основным местом локализации тучных клеток и базофилов является подслизистый слой бронхов. При стимуляции аллергеном их количество увеличивается в 10 раз. Наряду с активацией Th2 тормозится функция субпопуляции Т-хелперов Th1, основная роль которых заключается в снижении гиперчувствительности слизистой бронхов. Th1-лимфоциты секретируют γ -интерферон, который тормозит синтез иммуноглобулина IgE В-лимфоцитами.

Патохимическая стадия характеризуется тем, что при повторном поступлении аллергена в организм больного происходит его взаимодействие с антителами, в первую очередь с IgE, на поверхности клеток-мишеней аллергии. При этом происходит дегрануляция тучных клеток и базофилов, активация эозинофилов, выделяется большое количество медиаторов воспаления, которые провоцируют клиническое проявление БА.

В патофизиологической и условно-рефлекторной стадиях под влиянием аллергена возникают приступы удушья, выдох затруднен, появляется свистящее дыхание. Болезнь приобретает хроническое течение, часто осложняется эмфиземой легких, разрастанием соединительной ткани вокруг бронхов и изменениями в мышце правого желудочка сердца с последующим развитием сердечной недостаточности.

Таким образом, atopическая БА относится к аллергическим заболеваниям, важным фенотипическим признаком которых является увеличение иммуноглобулинов класса E (IgE).

6.1.2. Генная сеть бронхиальной астмы

Учитывая сложность патогенеза заболевания, логично предполагать, что генная сеть БА достаточно сложная и содержит много генов-кандидатов. Действительно, общегеномный генетический скрининг позволил обнаружить на 10 различных хромосомах 15 локусов, ассоциированных с БА (рис. 6.1.2).

Дальнейший анализ показал, что в патогенезе БА принимают участие много разных функционально взаимосвязанных генов (генных

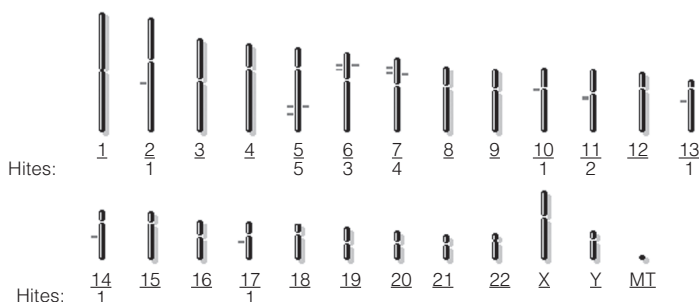


Рис. 6.1.2. Расположение на хромосомах локусов, ассоциированных с БА

ИММУННЫЕ ФАКТОРЫ И ИХ РЕЦЕПТОРЫ

- Интерлейкины: 4 (*IL4*, *IL4RA*); *IL5*(*IL5RA*); *IL9*; *IL13*
- Фактор роста тучных клеток *MGF*
- Фактор некроза опухоли- α *TNFA*
- Рецептор иммуноглобулина E — *IGE*

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

- Адренорецептор $\beta 2$ — *ADRB2*
- Глюкокортикоидный рецептор — *GRL*
- Рецептор серотонина — *HTR2A*

БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА

СИСТЕМА ДЕТОКСИКАЦИИ

- N-ацетилтрансфераза 2 *NAT2*
- Глутатион-S-трансфераза P1 *GSTP1*
- Глутатион-S-трансфераза M1 *GSTM1*
- Глутатион-S-трансфераза T1 *GST T1*
- Цитохром *CYP1A1*
- Металлопротеиназа 33 *ADAM33*
- Белок секреторных клеток бронхов *CC-16*

МЕДИАТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛОВ

- Лейкотриен C4-синтаза *LTC4S*
- Арахидонат-5 липоксигеназа *ALOX5*
- Фактор высвобождения гистамина *HRF*
- Тирозинкиназа 1 семейства Jak *JAK1*
- Трансмиттер и активатор транскрипции *STAT6*
- Неврональная NO-синтаза *NOS1*

Рис. 6.1.3. Генные сети бронхиальной астмы

сетей), включающие как главные, ключевые гены, так и гены-модификаторы, фенотипический эффект которых зависит от факторов внешней среды, таких как аллергены, инфекционные агенты, поллютанты, неблагоприятные метеорологические условия и пр. Наибольшее значение в формировании БА, безусловно, принадлежит различным аллергенам. Основные генные сети, определяющие наследственную предрасположенность и особенности этиопатогенеза БА, представлены на рисунке 6.1.3.

Число генов-кандидатов БА постоянно увеличивается и по некоторым данным составляет около 100. При этом выявлены значительные межпопуляционные различия многих ассоциаций, а данные разных лабораторий даже одной страны часто не совпадают. Можно ожидать, что их наиболее полный и достоверный набор появится уже в скором будущем, когда будет завершена Международная программа «GABRIEL», целью которой является полногеномный скрининг генов-кандидатов БА. С этой целью будет применен метод общегеномного скрининга ассоциаций (Genome Wide Association Studies — GWAS), основанный на использовании программы НарМар в сочетании с техникой биочипов высокого разрешения. Метод позволяет одновременно выявлять все однонуклеотидные замены (SNP), достоверно сцепленные с заболеванием. Зная точное положение каждого SNP на физической карте гаплоидного генома, можно идентифицировать все кандидатные гены и все локусы, содержащие аллельные SNP-варианты, ассоциированные с болезнью [558]. Такая технология была с успехом применена для идентификации генов и генетических локусов, ассоциированных с 10 частыми мультифакториальными заболеваниями, такими как диабет, болезнь Крона, ревматоидный артрит, маниакально-депрессивный психоз, коронарная болезнь и другие [766].

В настоящее время установлена ассоциация атопической БА, по крайней мере, с 35 различными генами, которые условно можно разделить на 5 групп (табл. 6.1.1).

1. Гены факторов антигенного распознавания и гуморального иммунного ответа (гены цитокинов главного комплекса гистосовместимости).
2. Гены медиаторов воспаления.
3. Гены рецепторов медиаторов и факторов гуморального иммунитета.
4. Гены внутриклеточных сигнальных молекул (гены факторов транскрипции).
5. Гены системы детоксикации, деградации и выведения из организма многочисленных ксенобиотиков, в том числе экзогенных аллергенов, а также эндотоксинов, провоцирующих патологический иммунный ответ (гены метаболизма).

Рассмотрим подробнее некоторые уже известные маркерные гены и их аллельные варианты, определяющие наследственную предрасположенность к БА.

Таблица 6.1.1

Гены-кандидаты БА

Ген	Хромосомная локализация	Белковый продукт	MIM
I. Гены факторов антигенного распознавания и иммунного ответа			
<i>IL4, IL5, IL9, IL13</i>	5q31.1	Интерлейкины	147780 147850 146931 147683
<i>HLA-B, -DR</i>	6p23–21	Антигены гистосовместимости	142830 142860
<i>MGF</i>	12q22	Фактор роста тучных клеток	184745
<i>TNFA</i>	6p21.3	Фактор некроза опухолей	191160
<i>TCRA</i>	14q11.2–12	а-субъединица антигенного рецептора Т-клеток	186880
II. Гены медиаторов воспаления и сопутствующих факторов			
<i>LTC4S</i>	5q35	Лейкитриен С4-синтаза	246530
<i>PAFAN</i>	6p21.2–12	Ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов	601690
<i>ALOX5</i>	10q11.2	Арахидонат 5-липоксигеназа	152390
<i>HRF</i>	13q12–14	Фактор высвобождения гистамина	600763
III. Гены рецепторов медиаторов и факторов гуморального иммунитета			
<i>IL5RA</i>	3p26–24	а-цепь рецептора ИЛ-5	147851
<i>GRL</i>	5q31.1–33	Рецептор глюкокортикоидов	138040
<i>ADRB2</i>	5q32–34	б2-адренергический рецептор	109690
<i>FCER1B</i>	11q12–13	б-цепь высокоаффинного рецептора IgE	147138
<i>HTR2A</i>	13q14–21	Рецептор серотонина	182135
<i>IL4RA</i>	16p12.1–11.2	а-цепь рецептора ИЛ-4	147781
IV. Гены внутриклеточных сигнальных молекул			
<i>JAK1</i>	1p31.3	Тирозинкиназа 1 семейства Jak	147795
<i>STAT6</i>	12q14.3–24.1	Трансмиттер сигнала и активатор транскрипции б	601512
<i>NFYB</i>	12q22–23	б-субъединица ядерного фактора транскрипции Y	189904
<i>NFKB1</i>	14q11.2–13	Субъединица 1 ядерного фактора транскрипции кВ	164011
<i>JAK3</i>	19p13.1	Тирозинкиназа 3 семейства Jak	600173

Таблица 6.1.1 (окончание)

Ген	Хромосомная локализация	Белковый продукт	MIM
V. Гены метаболизма			
<i>GSTM1</i>	1p13.3	Глютатион-S-трансфераза MU-1	138350
<i>BCL6</i>	3q27	Протеин лимфомы В-клеток 6	109565
<i>CYP1A1</i>	15q22–24	Цитохром p450	108330
<i>NAT2</i>	8p23.1–21.3	N-ацетилтрансфераза 2	243400
<i>ADAM33</i>	20p13	Дезинтегрин и металлопротеиназа 33	607114
<i>CC16</i>	11q12–13	Утероглобин	192020
<i>GSTT1</i>	22q11.2	Глютатион-S-трансфераза THETA-1	600436
Примечание. MIM — номер по каталогу «Mendelian Inheritance in Man»			

6.1.3. Гены цитокиновой системы

Решающая роль в развитии воспалительной реакции бронхов принадлежит цитокиновой системе. Известно, что цитокины участвуют в передаче межклеточных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей. В отличие от гормонов, поддерживающих гомеостатический баланс, цитокины определяют ответную тканевую реакцию на внедрение чужеродных тел, иммунное повреждение, а также воспаление. К цитокинам относятся интерлейкины, фактор некроза опухоли, интерфероны, калликреины-кинины, серотонин, гистамин и другие вещества. Цитокиновая система характеризуется высокой надежностью, однако существующий в организме баланс цитокинов легко нарушается многочисленными факторами, такими как инфекция, радиация, УФ-облучение, гипертермия, токсины, гормоны и др. [187].

Гены, ответственные за синтез цитокинов и их рецепторов, являются индуцибельными, т. е. активируются различными индукторами как эндогенной, так и экзогенной природы [224].

Гены интерлейкинов IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 расположены кластером на хромосоме 5 в области 5q31–33. Во многих работах по картированию генов-кандидатов БА показано тесное сцепление заболевания с этим локусом. При изучении полиморфных вариантов генов интерлейкинов установлена ассоциация гаплотипа –590T + 130Gln (ген *IL4* и ген *IL13* соответственно) с БА, атопическим дерматитом и атопией, определяемым по кожным аллерготестам [742]. В обстоятельных исследованиях сотруд-

ников НИИ медицинской генетики СО РАМН г. Томска изучены восемь вариантов полиморфизма шести интерлейкиновых генов (*IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL4RA*, *IL5RA*, *IL5RB*) в семьях с atopической БА. Впервые установлена тесная ассоциация полиморфизма **–703C/T гена *IL5*** с этим заболеванием [169]. Данный полиморфизм локализован в промоторной области гена, и ее фенотипический эффект заключается в изменении экспрессии гена *IL5*. Предполагается, что ассоциация с БА объясняется способностью IL-5 к активации эозинофилов, принимающих участие в развитии воспаления в бронхах. Показано также, что полиморфизм в области 3'-UTR гена *IL4*, находящийся в неравновесии по сцеплению с мутацией **–590C/T**, имеет прогностическое значение в отношении степени тяжести atopической БА.

Опубликованы данные об участии IL-4 в развитии воспаления легких путем индукции эндотелиальных молекул адгезии (VCAM)-1 [605]. Показано, что через них IL-4 направляет миграцию Т-лимфоцитов, моноцитов, базофилов и эозинофилов к месту воспаления.

Ген интерлейкина 4 (*IL4*)

В настоящий момент известно несколько **полиморфных вариантов гена *IL4***. Функционально значимым полиморфным вариантом является замена С на Т в положении **–590** промоторной области гена (***C-590T***). Информация о влиянии данного полиморфизма на развитие аллергического воспаления довольно противоречива. Согласно некоторым данным, в американской популяции этот полиморфизм ассоциирован с повышенной промоторной активностью гена *IL4* и высоким уровнем общего IgE в сыворотке крови у больных atopической БА [289, 697]. Подобная ассоциация получила подтверждение в исследованиях японской популяции [570]. Однако, согласно французским авторам, не выявлено ассоциации данного полиморфизма с содержанием общего IgE [721]. При исследовании австралийской популяции показана ассоциация данного полиморфизма с увеличением IgE, специфического к клещам домашней пыли, но не с увеличением общего IgE [799]. Согласно отечественным данным, полиморфизм *IL4* также обнаруживает четкую ассоциацию с повышенным и пролонгированным синтезом IgE [169].

В наших исследованиях, проведенных на 200 больных БА Северо-Западного региона России, отмечено некоторое, статистически недостоверное, увеличение частоты Т-аллеля *IL4* по сравнению с контрольной группой (29,8% и 18,1% соответственно) [115]. Вместе с тем, распределение генотипов по гену *IL4* у больных БА достоверно отличалось от такового в контрольной группе. Так, частота генотипа **–590C/T *IL4*** достоверно

увеличена у больных БА (51,1 %) по сравнению с контрольной группой (27,5 %) (OR = 2,74; CI: 1,27–5,92). У мужчин частота Т-аллеля гена *IL4* составляет 40,9 %, что несколько выше, чем у женщин (26,4 %), и достоверно выше, чем у мужчин в контрольной группе (19,2 %) (OR = 2,91; CI: 1,07–7,86). Интересно, что распределение генотипов по гену *IL4* у больных БА в зависимости от пола отличалось высокой достоверностью ($p < 0,01$), тогда как в контрольной выборке такой зависимости не отмечено. Установлено, что гетерозиготы по Т-аллелю у больных БА мужского пола (81,8 %) встречаются достоверно чаще, чем среди женщин с БА (41,7 %) и достоверно чаще, чем у мужчин контрольной группы (28,2 %). Согласно коэффициенту соотношения шансов, риск развития аллергической БА у мужчин при наличии генотипа –590С/Т *IL4* увеличивается более чем в 11 раз (OR = 11,5; CI: 2,57–50,87) [115, 679].

В мировой литературе нет четких данных о роли полиморфизма С-590Т гена *IL4* в развитии аллергического воспаления. Согласно некоторым исследованиям, этот полиморфизм ассоциирован с повышенным уровнем общего IgE в сыворотке крови больных атопической БА. В других исследованиях подобная ассоциация не была выявлена [721, 799]. Однако эти исследования проводились без учета пола пациентов и степени тяжести заболевания. Четкая ассоциация полиморфизма С-590Т гена *IL4* с тяжестью течения БА и полом пациента зарегистрирована в работах отечественных авторов [115, 169]. Другой полиморфизм гена *IL4* — 3'-UTR717 G/C, как недавно установлено, ассоциирован с тяжелой формой БА у якутов [163].

Ген альфа-цепи рецептора интерлейкина 4 (*IL4RA*)

В настоящее время известно несколько вариантов полиморфизма гена рецептора IL-4R α . Функционально значимым вариантом является замена аденина на гуанин в положении 1902 кДНК последовательности гена *IL4RA*, вследствие чего происходит замена глутамина (Q) на аргинин (R) в 576 положении аминокислотной последовательности α -цепи рецептора (Q576R) [742]. Единого мнения о влиянии этого полиморфизма на развитие БА не существует.

В 1997 году была установлена статистически значимая ассоциация 576R аллеля с атопией и предложено возможное объяснение такой ассоциации [742]. Было показано, что 576R форма рецептора обладает пониженным сродством к внутриклеточной тирозинфосфатазе SHP-1, включающей сигнал терминации транскрипции гена *IL4*. Таким образом, индивиды с 576R аллелем характеризуются утратой супрессии синтеза

IL-4. Был сделан вывод, что аллель 576R предрасполагает к развитию аллергии путем изменения сигнальной функции рецептора IL-4R α . Данные, что аллель 576R предрасполагает к атопии, были подтверждены другими работами [636, 760]. Однако исследования на японской и итальянской популяциях не подтвердили ассоциацию полиморфизма Q576R с атопией [376, 627, 629]. Более того, в исследовании немецкой популяции отмечено, что аллель 576R ассоциирован с пониженной концентрацией IgE [548]. Данный эффект усиливается в присутствии аллеля 478Pro другого полиморфизма Ser478Pro гена *IL4RA*. Отсутствие ассоциации Q576R полиморфизма с БА отмечено и при исследовании сегрегации соответствующих маркерных аллелей у больных БА и их родителей [169].

Согласно нашим данным, у больных БА отмечается повышение частоты аллеля 576R гена *IL4RA* (26,6%) по сравнению с контрольной группой (17,4%) [115]. При этом частота генотипа 576 R/R у больных БА (6,4%) существенно превышает таковую в контрольной группе (1,4%). У мужчин с БА выявлено достоверное увеличение частоты аллеля 576R (45,5%) по сравнению с пациентами женщинами (20,8%) и с мужчинами контрольной группы (15,4%) (OR = 4,58; CI: 1,69–12,36). Различия частот генотипов по гену *IL4RA* у больных БА в зависимости от пола были высокодостоверны. В контрольной выборке такая зависимость отсутствовала. Гетерозиготы по аллелю 576R в группе больных БА мужского пола (72,7%) встречались достоверно чаще, чем у женщин с БА (30,6%) и у мужчин контрольной группы (30,8%). Согласно коэффициенту соотношения шансов, риск развития аллергической БА у мужчин при наличии генотипа 576Q/R *IL4RA* увеличивается в 6 раз (OR = 6,0; CI: 1,47–24,32) [116].

Интересно, что комбинация двух **редких аллельных вариантов генов *IL4* и *IL4RA*** достоверно чаще зарегистрирована у больных БА (31,9%) по сравнению с контрольной группой (11,6%). Риск развития атопической БА при наличии «мутантного» аллеля в гомо- или гетерозиготном состоянии в обоих генах возрастает более чем в 3 раза (OR = 3,57; CI: 1,41–9,02). Среди мужчин, больных БА, такое сочетание аллелей встречается достоверно чаще (63,6%) по сравнению с пациентами женского пола (22,2%) и с мужчинами контрольной группы (7,7%). Риск развития атопической БА у мужчин при данном генотипе увеличивается более чем в 20 раз (OR = 21; CI: 4,89–90,12) [115].

Возможное объяснение ассоциации полиморфных вариантов генов *IL4* и *IL4RA* с развитием БА у мужчин заключается в том, что некоторые

функциональные характеристики интерлейкина-4 близки интерлейкину-13. В частности, α -цепь рецептора интерлейкина-4 необходима для передачи сигнала интерлейкина-13. В свою очередь, интерлейкин-4 взаимодействует с α -1 цепью рецептора интерлейкина-13, ген которого локализован на X-хромосоме (Xq13) и ассоциирован с повышенным уровнем IgE у больных БА.

Фактор некроза опухоли (TNF- α)

Продукт гена *TNFA* — фактор некроза опухоли альфа (TNF- α , кахектин) — относится к цитокиновой системе и представляет собой клеточный медиатор макрофагов и лимфоцитов, играет важную роль в регуляции процессов дифференцировки, роста и метаболизма клеток, является медиатором воспалительных процессов, инициирует образование свободных радикалов и может способствовать развитию оксидативного стресса [603, 754].

Роль TNF- α в развитии оксидативного стресса заключается в активации индуцибельной NO-синтазы (iNOS) — энзима, ответственного за синтез оксида азота, играющего важную роль в образовании и трансформации свободных радикалов.

Существуют данные об ассоциации полиморфных аллелей гена *TNFA* с развитием некоторых легочных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких, атопическая БА, бронхолегочная дисплазия у новорожденных [181, 304, 536].

Известно по крайней мере 8 полиморфных вариантов гена *TNFA*. Фенотипический эффект некоторых из них, особенно локализованных в промоторной области гена, хорошо изучен на молекулярном и биохимическом уровнях.

В случае полиморфизма G-238A гена *TNFA* аллель A ассоциирован с пониженной продукцией TNF- α [773]. Согласно нашим данным [20], у больных БА в отличие от популяционной выборки отмечено достоверное уменьшение частот генотипа A/G и аллеля A. Согласно коэффициенту соотношения шансов генотип -238 A/G гена *TNFA* снижает риск развития атопической БА (OR = 0,1975).

Другой полиморфизм промоторной области гена *TNFA* G-308A ассоциирован с повышением продукции TNF- α . Показано достоверное увеличение частоты аллеля A у больных БА по сравнению с популяционной выборкой. Риск развития БА у лиц с редким аллелем A в положении -308 промоторной области гена *TNFA* возрастает в 2,4 раза [20].

Известно, что провоспалительный цитокин TNF- α активирует NO-синтазу, что приводит к увеличению продукции NO, обладающего в по-

вышенных концентрациях цитотоксическими свойствами. NO образует активные промежуточные соединения, такие как нитрозоний (NO^+), нитроксил (NO^-) и пероксинитрит (ONOO^-). Последний является источником свободного гидроксил-радикала OH, который ведет к перекисному окислению липидов, следствием которого может быть «оксидативный стресс».

Естественно предполагать, что снижение экспрессии гена *TNFA* в случае аллеля $-238A$ приводит к уменьшению концентрации TNF- α белка и, соответственно, к снижению уровня iNOS. Напротив, аллель $-308A$ усиливает экспрессию гена *TNFA* и способствует повышению содержания iNOS, что сопровождается увеличением концентрации свободных радикалов, играющих важную роль в иммуновоспалительных процессах и в развитии оксидативного стресса. Накопление свободных радикалов, в свою очередь, вызывает дегрануляцию тучных клеток дыхательных путей. При этом высвобождается широкий спектр биологически активных веществ, воздействие которых на клетки легочного эпителия индуцирует воспалительный процесс в бронхах, обуславливает их гиперчувствительность и гиперреактивность.

Следует подчеркнуть, что в наших исследованиях частота аллеля *A* в положении -308 гена *TNFA* оказалась значительно выше у больных БА женщин, чем у больных БА мужчин или у женщин популяционной выборки. Риск развития БА у женщин, имеющих данный аллель, увеличивается в 3,8 раза [20]. Уместно отметить, что продукция TNF- α регулируется эстрогеном [777]. Существует предположение, что в женском организме с высокой и циклически меняющейся концентрацией эстрогенов колебания содержания TNF- α в клетках эпителия дыхательных путей выражены сильнее, чем у мужчин. Эти колебания, по-видимому, могут быть пусковым механизмом развития тех форм атопической БА, патогенетическую основу которых составляют воспалительные реакции легочного эпителия.

Точный биомеханизм действия гена *TNFA* в патогенезе БА до конца не выяснен. Однако наличие аллеля $-308A$ уже сейчас следует рассматривать как фактор наследственного риска атопической БА. Напротив, аллель $-238A$ даже в гетерозиготном состоянии и, тем более, в компаунде с $-308G$ аллелем можно рассматривать как благоприятный протективный признак в отношении заболевания, особенно у детей в семьях высокого риска.

Таким образом, анализ уже имеющихся данных свидетельствует о том, что полиморфизм цитокиновых генов *IL5*, *IL4*, *IL4RA* и *TNFA* является важным наследственным фактором предрасположенности к БА и атопии.

6.1.4. Гены системы синтеза оксида азота

В последнее время в качестве маркера аллергического воспаления рассматривается оксид азота (NO). Обнаружены повышенные концентрации NO в выдыхаемом воздухе у больных БА [253] и с бронхоэктатической болезнью. Источником окиси азота в выдыхаемом воздухе таких больных оказались нижние отделы респираторного тракта, причем ее уровень снижался при лечении глюкокортикоидами. В настоящее время определение выдыхаемого NO используется как способ оценки активности воспаления и эффективности противовоспалительной терапии при БА.

Известно, что оксид азота является важным биологическим медиатором и вовлечен во многие метаболические процессы. В частности, участвует в реализации таких важных физиологических функций, как расширение сосудов, проведение нервных импульсов, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляция тонуса гладких мышц и др.

В организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинин [619]. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную реакцию, катализируемую ферментом NO-синтазой (NOS), который присоединяет молекулярный кислород к конечному атому азота гуанидиновой группы L-аргинина.

В настоящее время идентифицированы три изоформы NO-синтаз, которые названы в соответствии с тем типом клеток, где они впервые обнаружены: NOS1 — нейрональная (nNOS); NOS2 — индуцибельная (iNOS), или макрофагальная (mNOS); NOS3 — эндотелиальная (eNOS) [96]. Изоформы NOS кодируются различными генами. Ген *NOS1* расположен на 12-й, *NOS2* — на 17-й и *NOS3* — на 7-й хромосомах. Хотя все изоформы NO-синтаз катализируют образование NO, каждая из них имеет свою локализацию и свой биомеханизм действия [626].

Иммуногистохимические исследования показали присутствие всех трех типов NO-синтаз в дыхательных путях человека [727]. Оксид азота участвует в таких процессах, как регуляция тонуса сосудов, бронходилатация, цилиарный транспорт, воспаление и иммунная защита [727]. При БА оксид азота, продуцируемый индуцибельной NO-синтазой (iNOS), усиливает воспалительные изменения в дыхательных путях [318].

Таким образом, оксид азота, продуцируемый различными изоформами NOS, принимает участие во многих жизненно важных физиологических процессах. Действие одной изоформы оксида азота (iNOS) проявляется в основном при патологических ситуациях.

Гены, кодирующие NO-синтазы, обладают аллельным полиморфизмом, ассоциированным с различным уровнем оксида азота. Так, число тринуклеотидных повторов ААТ в 20-м интроне гена *NOS1* коррелирует с увеличением концентрации оксида азота в выдыхаемом воздухе. Наличие более 12 таких повторов в гене *NOS1* ассоциировано с развитием atopической БА [418].

Полиморфизм в интроне 4 гена *NOS3* представлен 2 аллелями: *4b*-аллель, в котором имеются 5 повторяющихся фрагментов 27 п. н., и *4a*-аллель, в котором только 4 таких повтора. Показано, что *4a/4a* генотипу соответствует максимальный уровень базального NO, тогда как при *4b/4b* генотипе уровень NO приблизительно в 2 раза ниже, а гетерозиготы *4b/4a* занимают промежуточное положение [444]. Имеются данные о взаимосвязи eNOS с развитием БА, особенно при наличии atopического воспаления [157]. Вместе с тем, согласно другим наблюдениям, полиморфные варианты генов *NOS1*, *NOS2* и *NOS3* ассоциированы с БА, но не с повышенным уровнем иммуноглобулинов Е (IgE).

В наших исследованиях полиморфизма гена *NOS3*, проведенных на 200 пациентах с БА, отмечено достоверное увеличение частоты аллеля *4a*, ассоциированного с высоким содержанием NO по сравнению с таковой в популяционной выборке [115]. Расчеты показали, что наличие данного аллеля увеличивает риск развития atopической БА более чем в 2 раза ($OR = 2,47$). Напротив, генотип *4b/4b*, которому соответствует сниженный уровень NO, в отношении БА оказался протективным ($OR = 0,27$). Кроме того, отмечена корреляция полиморфизма гена *NOS3* с тяжестью БА. Частота аллеля *4a* у больных БА среднетяжелого течения составляет 31,6% и почти в 2,5 раза превышает таковую у больных с легким течением БА (12,0%). В группе со среднетяжелой формой БА генотип *4a/4a* встречается в 5 раз чаще (15,8%), чем в контрольной группе (2,9%) [116].

Другая важная особенность, выявленная в наших исследованиях, касается существенных гендерных различий частот *4a* и *4b* аллелей гена *NOS3*. У больных БА женского пола частота неблагоприятного генотипа *4a/4a* достоверно выше, чем в популяционной выборке или даже у мужчин с БА. При этом риск развития БА у женщин с таким генотипом возрастает почти в 8 раз. Наличие даже одного *4a* аллеля увеличивает риск заболевания в 2,5 раза. Генотип *4a/4b* у лиц мужского пола повышает риск БА в 3,7 раза [115].

Гендерные различия частот аллелей у больных БА выявлены и в отношении другого полиморфизма промоторной области гена *NOS3*

(–786С/Т). Показана роль промоторного варианта гена *NOS3* (–786С/Т) в развитии астмы у мужчин, но не у женщин [493].

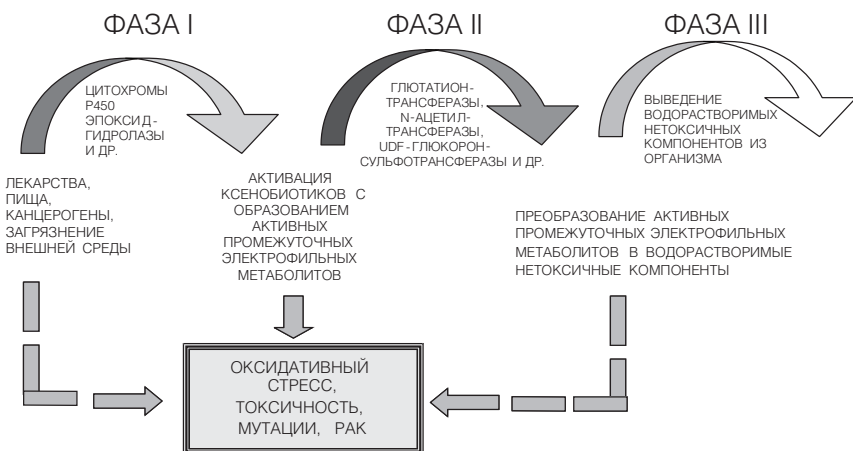
Корреляция БА с полиморфизмом генов, продукты которых контролируют окислительные процессы, нейтрализацию свободных радикалов и перекисных соединений, подтверждается и анализом аллельных частот двух точковых мутаций –20А > Т и –262 С > Т в 5' фланкирующей области гена каталазы *CAT* у 215 больных БА г. Курска [13]. Установлено, что у больных БА частота аллеля –20Т и генотипа –20Т/–20Т достоверно меньше, чем в контроле. Предполагается, что аллель –20Т усиливает активность каталазы и снимает окислительный стресс, чем и объясняется его протективный эффект.

Таким образом, имеющиеся результаты свидетельствуют о том, что определенные «функционально ослабленные» аллели генов NO-синтаз (*NOS3* и *NOS*), а также их неблагоприятные сочетания и, по-видимому, аллельные варианты гена каталазы следует рассматривать как факторы наследственного риска развития БА, конечный фенотипический эффект которых зависит от пола индивида, а частота коррелирует с тяжестью патологического процесса.

6.1.5. Гены метаболизма

У 2–15% пациентов с БА основной причиной заболевания является воздействие на ткани легкого органических и неорганических химических соединений. Как известно, устойчивость организма к неблагоприятным факторам внешней среды в значительной мере зависит от состояния ферментов системы детоксикации ксенобиотиков или системы метаболизма. Процесс детоксикации представляет собой довольно сложную систему взаимодействия различных ферментов с экзогенными веществами, в том числе с токсическими соединениями, и включает три последовательные фазы. Ферменты первой фазы связывают ксенобиотики и эндобиотики с образованием промежуточных электрофильных метаболитов, нередко токсических, которые под воздействием ферментов 2-й фазы превращаются в водорастворимые нетоксические производные и выводятся из организма (3-я фаза). Гены, контролирующие синтез этих ферментов, относятся к типичным представителям генов «внешней среды» (биотрансформации) и характеризуются значительным популяционным полиморфизмом (рис. 6.1.4).

Группа генов детоксикации 2-й фазы представлена суперсемейством глутатион-S-трансфераз (GST). GST катализируют взаимо-



Сочетанное действие ферментов системы детоксикации обеспечивает обезвреживание тысяч ксенобиотиков, включая самые разные лекарства. Оно определяет индивидуальную реакцию организма и составляет основу персонифицированной фармакогенетики и фармакогеномики

Рис. 6.1.4. Основные фазы системы детоксикации

действие глутамата с электрофильными атомами N, C, S, O и отвечают за конъюгацию сульфгидрильной группы с молекулами ксенобиотиков. Полиморфизм глутатион-S-трансфераз (GST) определяет индивидуальную чувствительность организма к воздействию факторов внешней среды [30]. Глутатион относится к водорастворимым антиоксидантам, присутствует в высоких концентрациях в каждой клетке, а также в сыворотке крови. Высокое содержание глутатиона определяется в слизи, покрывающей эпителий легких, которая является первой линией защиты дыхательных путей от экзогенных токсинов вдыхаемого воздуха. Известно, что глутатион-опосредованная детоксикация — играет ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, к свободным радикалам, алкилированию белков. Ферменты GST широко представлены во всех органах и тканях. Особенно высоко их содержание в печени, плаценте, легких, мозге, почках, кишечнике.

Центральное место в семействе глутатион-S-трансфераз занимают гены *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*, функционально ослабленные аллели которых ассоциированы с развитием таких заболеваний легких, как хронический бронхит, рак, эмфизема [30].

Мутантные аллели генов *GSTT1* и *GSTM1* характеризуются наличием протяженных делеций, следствием чего является полное отсутствие

соответствующих ферментов. Отсюда их нередко называют «нулевыми аллелями».

Третий ген этого семейства *GSTP1* кодирует плацентарную глутатион-S-трансферазу P1 и является особенно привлекательным геном-кандидатом БА и атопии. Во-первых, после рождения ген *GSTP1* экспрессируется почти исключительно в легочной ткани. Во-вторых, он расположен в локусе 11q13, для которого неоднократно показано сцепление с атопическими признаками. У европеоидов описано два вида функционального полиморфизма *GSTP1*: Ile105Val и Ala114Val. Трансцизия G431T в 6 экзоне гена *GSTP1* ведет к замене изолейцина на валин в 105 положении. При этом в 7 раз повышается активность фермента к ароматическим соединениям, но в 3 раза снижаются детоксикационные свойства по отношению к бензопирену. Отмечаются нарушения детоксикации метаболитов, образующихся в 1-й фазе детоксикации. Показано, что гомозиготность по аллелю *105Val* является протективным фактором в отношении атопии.

Еще один важный ген фазы 2 детоксикации *NAT2* отвечает за синтез фермента ариламин-N-ацетилтрансферазы, играющего важную роль в детоксикации ксенобиотиков, содержащих ароматические аминные или гидразиновые группы [30]. Наличие 3 полиморфных сайтов в кодирующей последовательности гена приводит к появлению 4 функционально различных форм фермента NAT2: три основных варианта «медленных» аллелей (*S1*, *S2*, *S3*) и одного «быстрого» (*F1*), которые функционально соответствуют медленным и быстрым «ацетиляторам». Многочисленными исследованиями четко установлена ассоциация полиморфизма гена *NAT2* с различными заболеваниями [30]. При этом в силу накопления в организме потенциально токсических продуктов фазы 1 риск неблагоприятного действия лекарственных препаратов, инфекций и окислительного стресса у медленных «ацетиляторов» существенно выше, чем у быстрых.

При изучении полиморфизма генов семейства *GST* у детей с БА Санкт-Петербурга в 93 % случаев выявлено наличие «функционально ослабленного генотипа», по крайней мере в одном из генов системы детоксикации.

Гомозиготы по «нулевым» аллелям сразу двух генов *GSTM10/0* и *GSTT10/0* среди больных БА встречаются в 4 раза чаще, чем в популяции (49 и 12 % соответственно), а риск развития БА у таких индивидов возрастает в 7 раз и более (OR = 7,15, CI: 2,70–18,98) (рис. 6.1.5) [71, 526, 593]. Одинаково неблагоприятным для прогноза БА оказывается сочетание в одном генотипе как функционально неблагоприятных ал-

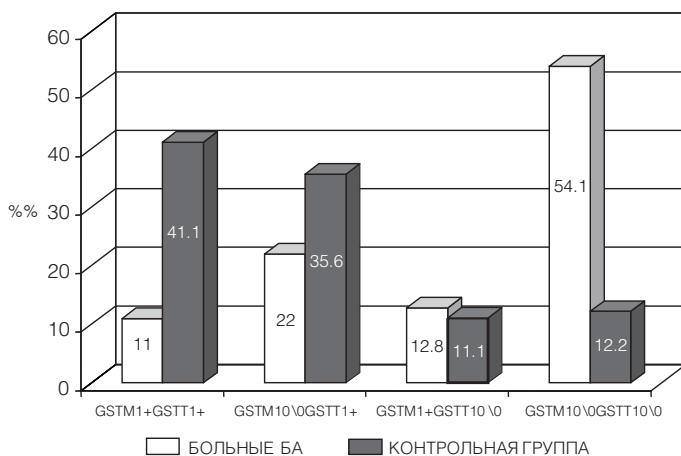


Рис. 6.1.5. Частота различных сочетанных генотипов по генам *GSTM1* и *GSTT1* у больных БА и в группе популяционного контроля

лелей семейства глутатионовых генов (*GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*), так и их комбинация с медленными (*S*) аллелями гена *NAT2* (рис. 6.1.6).

Сочетание «функционально ослабленных» генотипов всех трех генов семейства *GST* у больных БА составило 35 %, тогда как у здоровых индивидуумов оно не превысило 8 % (OR = 6,29, CI: 2,08–19,08).

Обстоятельные исследования вклада полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков, проведенные в НИИ медицинской генетики СО РАМН г. Томска, подтверждают ее существенный вклад в предрасположенность к развитию БА [169]. На репрезентативной выборке больных БА (131 человек) методом «случай–контроль» установлено, что у лиц, гомозиготных по «нулевому» аллелю гена *GSTM1*, риск БА возрастает в 2 раза и имеется тенденция к ассоциации с БА аллеля *105V* гена *GSTP1*. Также в наших исследованиях отмечена достоверная корреляция «нулевого» аллеля гена *GSTT1* с тяжестью заболевания. Кроме того, показана ассоциация с БА полиморфизма 7632T/A гена *CYP2 E1* (1-я фаза детоксикации) и полиморфизма 681G/A гена *CYP2C19* (1-я фаза детоксикации). Установлен также протективный эффект сочетанного генотипа *GSTM1*+/+ и *GSTP1* 313 G/G в отношении БА и фактор риска БА — сочетанный генотип *GSTM1*0/0 и *CYP2 E1* 7632T/A [162].

В исследованиях датских авторов частота гомозигот *GSTM1*+/+ в 249 семьях высокого риска БА оказалась в 10 раз меньше ($p < 0,0005$), а частота неблагоприятного «нулевого» аллеля соответственно выше, чем в кон-

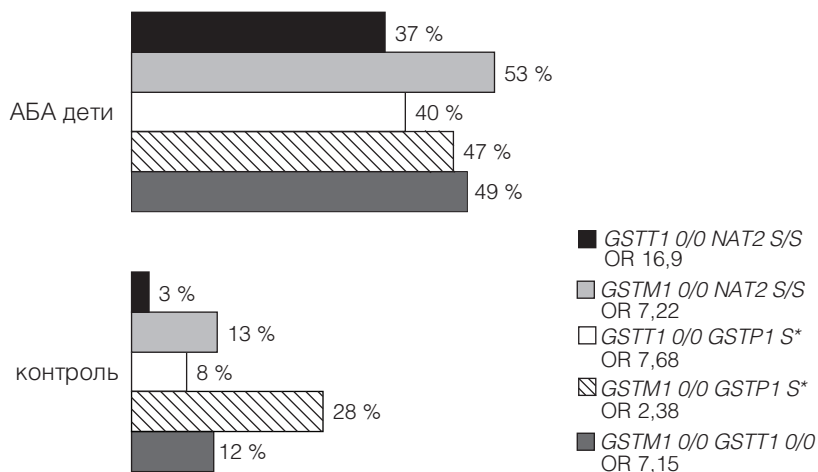


Рис. 6.1.6. Соотношения частот сочетанных генотипов по генам системы детоксикации у детей с atopической БА и у здоровых детей группы контроля

трольной группе [687]. Отмечено также увеличение частоты «нулевого» *GSTT1* аллеля у больных и необычно высокая частота передачи этого аллеля в потомстве гетерозиготных носителей и у больных БА ($p < 0,019$).

Таким образом, несмотря на некоторые различия, связанные с популяционными, клиническими и методическими особенностями, результаты генетического тестирования разных лабораторий доказывают важность роли генов системы детоксикации в патогенезе БА. Можно предполагать, что токсические метаболиты, образующиеся в первой фазе детоксикации, вследствие отсутствия нормально функционирующих ферментов 2-й фазы, не утилизируются, а, воздействуя непосредственно на клетки эпителия дыхательных путей, вызывают воспалительный процесс в бронхах, стимулируя их гиперчувствительность и гиперреактивность.

Уместно также напомнить, что, помимо детоксикации, ферменты семейства GST выполняют и ряд других важных функций. В частности, изомеризируют стероиды и простагландины, участвуют в биосинтезе и метаболизме лейкотриена C4, являются транспортными белками стероидных гормонов.

Нарушение этих важных функций при «нулевых» и функционально ослабленных вариантах генов семейства *GST* также может иметь большое значение в этиологии и патогенезе БА.

Таким образом, не вызывает сомнения, что «мутации» в генах системы детоксикации, в первую очередь семейства *GST*, можно рас-

смаатривать как факторы риска развития БА. В целом уже имеющиеся данные свидетельствуют о заметном вкладе полиморфизма генов ферментов биотрансформации в развитие БА. В первую очередь это относится к генам *GSTM1* и *GSTT1*, «нулевые» варианты которых обнаруживают четкую ассоциацию с атопическими заболеваниями, в том числе и с БА, практически во всех проведенных исследованиях. Выявлены прогностически неблагоприятные в отношении наследственного риска сочетания аллелей генов 1-й и 2-й фаз детоксикации.

6.1.6. Другие гены-кандидаты бронхиальной астмы

Ген *ADAM33*

Ген *ADAM33* (disintegrin и metalloproteinase 33) — первый ген суперсемейства металлопротеаз, идентифицированный методом позиционного картирования как предполагаемый ген-кандидат астмы и гиперреактивности бронхов на 460 парах сибсов из семей с БА в США и Великобритании. Ген картирован на хромосоме 20p13, обнаруживает четкую ассоциацию с БА и гиперчувствительностью бронхов [514]. Он относится к суперсемейству генов *ADAM*, которые кодируют мембранные белки, имеющие два функциональных домена — дезинтегриновый и металлопротеазный. В настоящее время известно около 35 генов семейства *ADAM*, кодирующих данный класс белков.

В настоящее время в гене *ADAM33* идентифицировано более 50 полиморфных сайтов. По крайней мере, для пяти из них показана ассоциация с БА у больных Германии, Соединенных Штатов и Великобритании, но не у больных БА Центральной Америки (Мексика и Пуэрто-Рико) и Китая.

Ген *ADAM33* экспрессируется в клетках эпителия легких, фибробластах субмукозного слоя стенки и в гладких мышцах бронхов. Его экспрессия существенно выше при БА тяжелого и среднетяжелого течения по сравнению с таковой при легком течении и с контролем [514].

Предполагается, что аллельные варианты *ADAM33* могут стимулировать пролиферативную активность фибробластов и гладких мышц субмукозного слоя стенки бронхов и, таким образом, нарушать процессы ремоделирования дыхательных путей, стимулировать гиперреактивность бронхов и вызывать субэпителиальный фиброз.

В зависимости от функциональной активности белковых продуктов полиморфные аллельные варианты гена *ADAM33* характеризуются либо потерей функции (loss-of-function), либо ее усилением (gain-of-

function). Первые приводят к уменьшению связывания белка с факторами роста, тогда как вторые, наоборот, могут увеличить сродство к факторам роста. Полиморфные варианты *ADAM33* могут также усиливать воспалительную реакцию, стимулируя выработку цитокинов и увеличение продукции Т-хелперов второго типа (Th2).

Ассоциация аллельных вариантов гена *ADAM33* с БА установлена для жителей Голландии (ST17, $p = 0,0093$; V4, $p = 0,0009$), афроамериканцев (S2, $p = 0,03$) и белых из США (ST17, $p = 0,017$; T1, $p = 0,03$; T2, $p = 0,02$), а также американцев испанского происхождения (S2, $p = 0,04$; T2, $p = 0,04$). Любопытно, что в разных популяционных выборках ассоциированными с БА оказались разные полиморфные варианты гена. Не найдено ассоциации БА ни с одним из 10 полиморфных сайтов (SNP) гена *ADAM33* в австралийской популяции [244], однако определенные комбинации таких полиморфных сайтов этого гена (гаплотипы V-1 & ST+7) обнаруживали ассоциацию как с самим заболеванием, так и с его тяжестью.

Таким образом, сведения об ассоциации полиморфизма гена *ADAM33* с БА не столь однозначны, как это предполагалось вскоре после его идентификации и проведения первых исследований по генетическому тестированию. По-видимому, ген *ADAM33* — только один из многих генов, вовлеченных в патогенез астмы. Тем не менее, большинство имеющихся на эту тему данных дают основание считать, что *ADAM33* можно рассматривать как основной ген-кандидат тяжести течения и хронического характера БА.

Ген *CC16*

Ген *CC16* определяет синтез одноименного белка специальными секреторными клетками бронхов (Clara cells), на долю которого приходится до 7% всех белков бронхиальной слизи, играющей важную роль в воспалительной реакции в бронхах. Ген *CC16* картирован в области 11q13, имеет частую (мажорную) «мутацию» (полиморфизм) в позиции 38 (A38G) в некодирующей части 1 экзона. 43,6% европейцев гомозиготны по наличию G-аллеля (38G/G) и 46,2% населения Европы гетерозиготны (38A/G). Остальные 10% населения представлены гомозиготами по A-аллелю (38A/A). Именно 38A/A гомозиготы, как было показано [235], имеют в 6–9 раз выше риск БА, чем в среднем в популяции. Более того, согласно тем же авторам, даже у 38A/G гетерозигот, составляющих половину населения Западной Европы, риск БА выше среднепопуляционного в 4,2 раза. В наших исследованиях больных БА,

независимо от пола и возраста, ассоциация данного полиморфизма с атопической БА не подтвердилась.

Семейство генов антитрипсина (AAT) на хромосоме 14 (14q32.1.) включает в себя два гена, кодирующих альфа-1-антитрипсин и альфа-1-антихимотрипсин. Оба продукта этих генов являются ингибиторами белка С и относятся к суперсемейству ингибиторов сериновой протеазы. Полиморфные варианты обоих генов функционально менее активны, зачастую ведут к дефициту ААТ, следствием которого могут быть хронические обструктивные заболевания легких, бронхоэктатическая болезнь и БА. В настоящее время известны более 150 аллельных вариантов *AAT* (так называемые *PI*-аллели), белковые продукты которых идентифицируются методом изоэлектрического фокусирования. Вопрос о том, в какой мере полиморфизм генов локуса *AAT* ассоциирован с БА, остается невыясненным.

Ген *ORMDL3* идентифицирован на 17-й хромосоме в ходе исследования почти 6 000 больных БА из США, Германии и Великобритании. В 2007 году появилось сообщение Международной группы по изучению генетики астмы об ассоциации этого гена с высокой вероятностью развития БА у детей. Было установлено, что аллельные варианты этого гена на 60–70% увеличивают риск развития заболевания, однако биомеханизм этой ассоциации остается невыясненным. По мнению ведущего специалиста этой группы профессора Вильяма Куксона (William Cookson), ген *ORMDL3* является самым серьезным из известных в настоящее время наследственных факторов риска развития БА.

Мутации гена *Filaggrin* (R501X или 228del4), контролирующего синтез линкерного белка кератина, как недавно было показано в обстоятельном мета-анализе, почти в 4 раза увеличивают частоту атопических заболеваний и тяжелых форм БА [776].

К сожалению, ни один из вышеприведенных генов-кандидатов БА, идентифицированных в последние годы, на отечественных больных изучен не был.

6.1.7. Анализ генетического риска и первичная профилактика бронхиальной астмы у новорожденных детей, родившихся от беременных женщин с бронхиальной астмой

До настоящего времени практически все исследования по предиктивной медицине, проводившиеся в мире и в нашей стране, носили ретроспективный характер, то есть сравнивая частоты аллелей у больных и у здоровых, анализировались ассоциации полиморфных вариантов

тех или иных генов-кандидатов с каким-нибудь МФЗ или его определенным фенотипическим признаком (симптомом) [30, 169].

В 2001 году в совместных исследованиях с врачами и сотрудниками Научно-исследовательского института пульмонологии Санкт-Петербургского СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова нами предпринята попытка объективизации оценки клинической значимости генетического тестирования этой патологии в семьях высокого риска. В результате выполнения работы предполагалось получить объективную информацию о целесообразности и клинической значимости **проспективного** генетического тестирования в профилактике частых МФЗ. Эти исследования представляют собой фрагмент общей научно-практической **программы** «Доклиническая диагностика и первичная профилактика БА и аллергических заболеваний у детей», подготовленной член-корреспондентом РАМН профессором Г. Б. Федосеевым (Научно-исследовательский институт пульмонологии Санкт-Петербургского СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова). Программа выполняется с 2001 года. Ее цель — выявление наиболее значимых генетических факторов риска развития БА у детей и разработка оптимального алгоритма тестирования наследственной предрасположенности к этому заболеванию для своевременного начала проведения научно обоснованной первичной профилактики. Исследование предполагало генетическое тестирование новорожденных от женщин, больных БА, идентификацию детей с высоким и низким наследственным риском БА и мониторинг состояния здоровья у детей с заведомо разным наследственным риском в течение 3–5 лет в отношении БА, ОРВИ.

В исследуемую группу вошли беременные с БА, клинически обследованные на базе кафедры госпитальной терапии им. акад. М. В. Чернуцкого НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. В работе использованы образцы ДНК, полученные из клеток крови 102 женщин с БА, а также образцы ДНК 102 новорожденных от женщин с БА. В качестве контроля использованы образцы ДНК от 75 беременных женщин без признаков БА или аллергических и аутоиммунных заболеваний.

Проведено исследование полиморфизма 7 генов-кандидатов: *GSTT1* (del), *GSTM1* (del), *CCR16* (G38A), *TNFA* (–238G/A; –308G/A), *IL4* (C–590T), *IL4R* (Q576R) и *NOS1* (повторы ААТ в 20 интроне), продукты которых играют важную роль в развитии атопической БА (см. выше). Все выбранные гены-кандидаты обнаружили неслучайное сцепление с атопической БА в наших предыдущих исследованиях (см. 6.1.3–6.1.5).

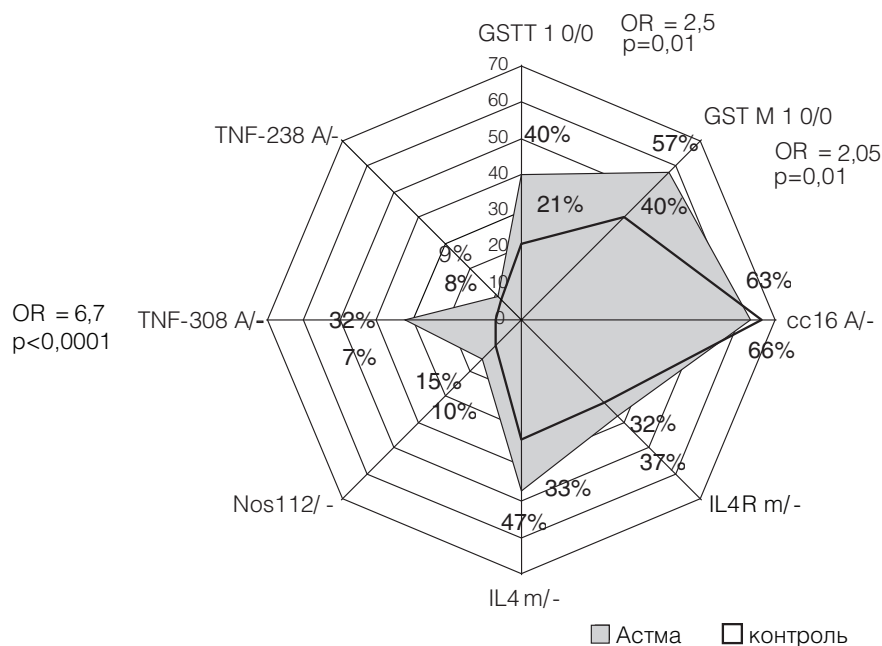


Рис. 6.1.7. Частота носительства «неблагоприятных» генотипов и аллелей по изученным генам у женщин с БА в сравнении с популяционным контролем

Частоты аллелей исследованных генов у беременных женщин с БА и в популяционной выборке женщин приведены на рисунке 6.1.7.

При анализе образцов ДНК беременных женщин с БА выявлено достоверное увеличение частоты сочетанных генотипов *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0. Относительный риск развития заболевания у гомозиготных носителей нулевых аллелей генов *GSTM1* и *GSTT1* повышен в 5 раз. Анализ частот генотипов и аллелей генов *CC16*, *NOS1*, *IL4* и *IL4R* не выявил достоверных различий между группой больных БА и контрольной группой. Вместе с тем комбинация двух редких аллельных вариантов генов *IL4* и *IL4R* чаще встречалась в группе больных БА по сравнению с контрольной группой. Риск развития атопической БА при наличии «мутантного» аллеля в гомо- или гетерозиготном состоянии в обоих генах увеличивается более чем в 3 раза.

Выявлено снижение частоты А-аллеля полиморфизма –238А/Г для гена *TNFA* у беременных с БА по сравнению с контролем. Наличие генотипа А/Г по этому полиморфизму ведет к уменьшению риска развития заболевания, то есть А-аллель в положении –238 оказывает протектив-

ный эффект. При анализе другого полиморфного варианта гена, *TNFA* –308G/A, отмечено увеличение частоты A-аллеля у больных БА по сравнению с популяционной выборкой. Риск возникновения заболевания при наличии A-аллеля в положении –308 гена *TNFA* увеличивается.

Таким образом, полученные результаты исследования аллельного полиморфизма всех 7 генов-кандидатов, ассоциированных с atopической БА, находятся в хорошем соответствии с ранее приведенными данными генетического тестирования больных БА (см. 6.1.3). Так же, как и в ранее проведенных исследованиях, отмечено накопление функционально ослабленных аллелей изученных генов у беременных женщин с БА.

Распределение полиморфных аллелей изученных генов у новорожденных от беременных с БА отличалось от такового у их матерей. С использованием метода «подсчета суммы баллов» [97, 159, 168] все новорожденные были разделены на несколько групп, отличающихся по риску развития БА и других atopических состояний. При подсчете суммы баллов гомозиготам по функционально нормальному полиморфизму (аллелю «дикого» типа –*Wt/Wt*) присваивали 1 балл, гетерозиготам по мутантному аллелю (*Wt/Mut*) — 2 балла и гомозиготам по мутации (*Mut/Mut*) — 3 балла. Полученные балльные оценки для каждого новорожденного рассчитывали по формуле $\sum m - k$, где m — сумма баллов всех индивидуальных генотипов, k — число изученных генов. На основании указанных подсчетов были выделены 3 группы новорожденных: с числом баллов менее 4 (низкая предрасположенность), 4 и более баллов (повышенный риск), 5 и более баллов (высокий риск). По результатам подсчетов баллов у 42 % новорожденных наследственный риск atopической БА оказался низким, у 39 % он был повышен, у 19 % оказался высоким (рис. 6.1.8).

Вскоре после генотипирования все новорожденные были включены в программу первичной профилактики БА, разработанной и уже в течение ряда лет успешно применяемой в НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова [93]. При наблюдении таких детей в течение двух лет установлено, что такие заболевания, как atopический дерматит, аллергические болезни, ОРВИ с частотой более 4 раз в год у детей групп повышенного и высокого риска БА по результатам генетического тестирования имели частоту 83, 23 и 58 % соответственно и встречались вдвое чаще, чем у детей в группе с низким генетическим риском (37, 23 и 30 % соответственно) (рис. 6.1.9).

Показана также важная роль первичной профилактики этих аллергических заболеваний у детей с наследственной предрасположенностью

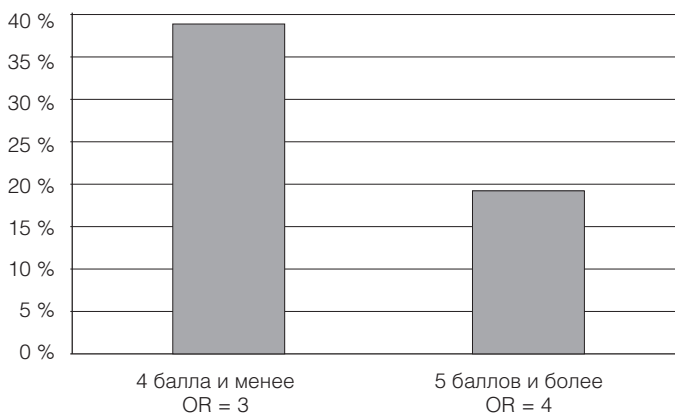


Рис. 6.1.8. Группы новорожденных с высоким (> 5) и низким (< 4) риском БА по результатам тестирования генов *GSTM1*, *GSTT1*, *IL4*, *IL4R* и *NOS1*



Рис. 6.1.9. Заболеваемость хроническим atopическим дерматитом, другими аллергическими заболеваниями и ОРВИ у детей с высоким (> 5) и низким (< 4) наследственным риском БА [93]

к БА. Клинические наблюдения за здоровьем детей, родившихся от матерей с БА, продолжаются.

Вместе с тем полученные результаты уже сегодня следует рассматривать как первое доказательство клинической целесообразности предиктивного (упреждающего) генетического тестирования наследственной предрасположенности к БА у детей в семьях высокого риска. Правильно организованная первичная профилактика позволяет предотвратить развитие аллергических заболеваний у таких детей.

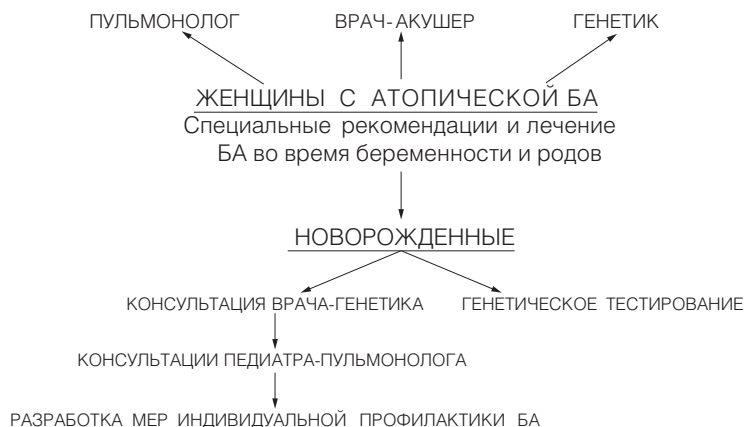


Рис. 6.1.10. Алгоритм первичной профилактики БА у детей в семьях высокого риска

На основании полученных результатов разработан алгоритм первичной профилактики БА у детей, матери которых страдают этим заболеванием (рис. 6.1.10).

Необходимы дальнейшие наблюдения за детьми групп наследственного риска, чтобы объективно оценить, в какой мере предиктивное генетическое тестирование может реально способствовать снижению частоты БА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние несколько лет ознаменованы большим прогрессом наших знаний в области генетической природы БА. Стало очевидным, что в это заболевание вовлечено множество генов, относящихся к разным генным сетям организма. Анализ уже имеющихся данных свидетельствует о несомненном участии в патогенетических механизмах БА генов систем цитокинов, детоксикации и оксидативного стресса. Наиболее перспективными генами-кандидатами БА, согласно нашим данным, на сегодня являются *GSTT1* (del), *GSTM1* (del), *TNFA* (308G/A), *IL4* (C-590T), *IL4R* (Q576R). Впервые установлено, что тестирование этих генов в семьях высокого риска БА позволяет выявлять детей, предрасположенных к заболеваниям легких, в том числе и к БА, задолго до появления клинических симптомов патологических процессов и заблаговременно начинать упреждающий комплекс профилактических мероприятий. Исследования

по проспективному генетическому тестированию наследственной предрасположенности к БА требуют дальнейшего развития. Безусловный интерес представляют исследования на больных БА отечественных популяций ассоциации БА с такими новыми кандидатными генами, как *ORMDL3*, *ADAM33*, *Flaggrin*, тесная ассоциация которых в отношении БА показана для ряда западноевропейских популяций. Решающее значение для идентификации всех генов-кандидатов и всех генетических локусов, ассоциированных с БА, может иметь общегеномный скрининг ассоциаций с использованием программы НарМар и чиповой технологии высокого разрешения (см. главу 4). Однако исследования только генетического компонента заведомо недостаточно для всестороннего понимания этиопатогенеза мультифакториальных заболеваний, к которым относится БА.

Существенный прогресс в генетике БА можно ожидать только в результате комплексного подхода, позволяющего оценить вклад не только генетических, но и средовых факторов в развитии патологического процесса. Выявление слабых звеньев в метаболических путях, контролируемых генами-кандидатами с учетом провоцирующих факторов внешней среды позволит решить сложную задачу по расшифровке генетического и эпигенетического компонентов этого частого заболевания, приблизит нас к пониманию механизмов взаимодействия полигенных систем на уровне целого организма и их реакций на повреждающие (провоцирующие) факторы внешней среды.

Большое значение для таких исследований могут иметь современные технологии микрочипов, успехи биоинформатики в изучении генных сетей, а также комплексный анализ синтропных по отношению к БА болезней [169], характеризующихся общностью наследственной составляющей с БА (атопические заболевания).

6.2. ОСТЕОПОРОЗ

Введение

Остеопороз — тяжелое поражение скелета, характеризующееся снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ), патологическими изменениями ее микроархитектоники, приводящими к деформации и повышенной ломкости костей.

Остеопороз занимает четвертое место среди важнейших причин заболеваемости и смертности пожилых людей [47]. Во многих странах

мира зарегистрировано увеличение частоты переломов, связанных с остеопорозом. Каждое десятилетие их число увеличивается примерно на 40% [517]. По данным ВОЗ, ежегодно в Европе регистрируется около 2,5 млн случаев переломов костей, спровоцированных остеопорозом. Предполагается, что к 2050 году эти показатели могут достигнуть 6 млн. По данным Л. И. Беневоленской [47], в результате обследования 521 жителя Москвы старше 50 лет рентгенологические признаки остеопороза позвоночника выявлены у 37,4%, а переломы тел позвонков на этом фоне — у 11,8% обследованных. В другой отечественной выборке из 2155 женщин в возрасте 55 лет и старше остеопороз поясничного отдела позвоночника был отмечен в 29,8% случаев, а остеопения — в 43,8% [374].

Процессы костного метаболизма регулируются генетическими и внешними факторами [48, 65]. Основной рост скелета происходит в пубертатном и постпубертатном возрасте. При достижении пика костной массы наступает относительно короткий период (от 25 до 35 лет) равновесия темпов костного **ремоделирования (баланс процессов формирования костной ткани и резорбции кости)**, а затем начинается ее прогрессивная потеря. У женщин после наступления менопаузы потеря костной массы возрастает до 2–3% в год. В среднем в течение жизни женщины теряют около 35–50% костной массы. Однако остеопороз и выраженная остеопения развиваются только у 30–40% всех женщин постменопаузального периода. У мужчин также отмечается возрастная потеря костной массы и снижение МПКТ, но эти процессы протекают медленнее и выражены не столь сильно, как у женщин.

Длительное время остеопороз может протекать бессимптомно. Его даже называют «молчаливой патологией». Наличие остеопороза может быть заподозрено по неясным болям в спине, особенно у женщин, относящихся к группе риска.

В последние два десятилетия разработаны высокоэффективные приборы для денситометрических исследований, позволяющие диагностировать костные потери с точностью до 2–6% в разных участках скелета. С этой целью используют изотопные методы (моно- и двухфотонная абсорбциометрия), рентгеновские (моно- и двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, количественная компьютерная томография), а также ультразвуковые методы. Монофотонные и моноэнергетические денситометры позволяют измерять МПКТ в периферических отделах скелета. Подробно с современными методами диагностики остеопороза можно ознакомиться в соответствующих рекомендациях и руководствах [9, 48].

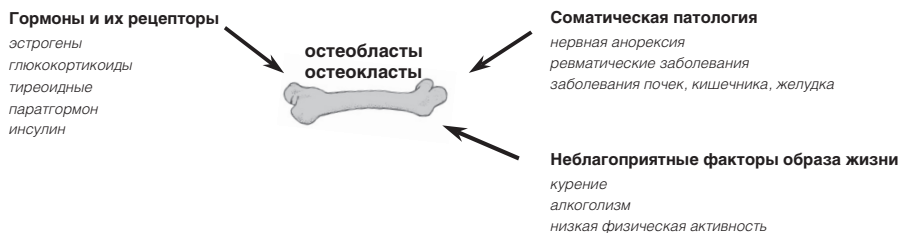


Рис. 6.2.1. Внешние факторы — «триггеры», влияющие на деятельность остеобластов и остеокластов

В настоящее время есть серьезные основания полагать, что основу межиндивидуальных различий в развитии остеопороза составляют как средовые, так и генетические факторы, уникальные для каждого человека. Это дает все основания рассматривать остеопороз как **мультифакториальное заболевание**. Согласно обобщенным данным, вклад внешних факторов в развитие остеопороза составляет 15–25%, тогда как на долю наследственных (генетических) причин приходится свыше 70% риска [48, 65].

6.2.1. Внешние факторы — «триггеры»

Возможные экзогенные причины снижения минеральной плотности костей, приводящие к **остеопении** (снижению МПКТ) и, следовательно, предрасполагающие к остеопорозу, приведены на рисунке 6.2.1. Среди **внешних факторов**, влияющих на минеральную плотность костной массы, следует выделить **гормоны (эндокринные заболевания), соматическую патологию и образ жизни**.

6.2.1.1. Гормоны

Важную роль в формировании скелета и в предотвращении потерь костной массы играют **эстрогены**. Молекулярные механизмы действия эстрогенов на костную ткань могут быть представлены следующим образом. Эстрогены воздействуют на имеющиеся в клетках костной ткани (**osteoblastы, osteокласты**) рецепторы посредством регуляции транскрипции специфических генов-мишеней. В результате включается транскрипция протеинов и цитокиноподобных факторов, которые влияют на аутокринные, паракринные и/или эндокринные механизмы, регулирующие развитие костной ткани.

Биологическое действие эстрогенов опосредуется протеинами и цитокинами в клетках-мишенях, в том числе в клетках, которые содер-

жат специфические ядерные рецепторы для эстрогенов. Дефицит эстрогенов приводит к снижению костной массы за счет нарушения баланса между процессами синтеза и резорбции кости, к уменьшению продукции кальцитонина, вызывает усиление костной резорбции. Следствием дефицита эстрогенов может быть нарушение продукции активного метаболита витамина D₃ (1,25(OH)D₃) и снижение абсорбции кальция в кишечнике, что приводит к потере МПКТ.

Таким образом, любые факторы, приводящие к постоянному или транзиторному дефициту эстрогенов в женском организме, могут быть причиной остеопороза.

Глюкокортикоиды непосредственно подавляют остеобластическую функцию, замедляют созревание клеток-предшественников остеобластов, ингибируют стимулирующий эффект простагландинов и ростовых факторов, усиливают ингибирующее действие паратгормона на зрелые остеобласты. Кроме того, их избыток оказывает не прямое стимулирующее влияние на костную резорбцию. Глюкокортикоиды замедляют абсорбцию кальция в кишечнике, уменьшают реабсорбцию кальция в почках, приводят к отрицательному балансу кальция в организме и транзиторной гипокальциемии. При длительном применении стероидных гормонов (например, при лечении бронхиальной астмы) может развиваться **стероидный остеопороз**.

Избыточная секреция **тиреоидных гормонов** ведет к повышению костного обмена. При этом происходит увеличение количества остеокластов, активируются процессы резорбции костных тканей, нарушается баланс резорбционных и костеобразующих центров. Увеличение резорбции костной ткани встречается у 50 % больных тиреотоксикозом. У женщин с гипотиреозом при средней длительности заместительной терапии 14 лет обнаруживали увеличение темпа костных потерь.

Сходным образом на метаболизм костной ткани влияет **гиперсекреция** паратгормона, приводящая к резкой активизации метаболизма костной ткани с преобладанием процессов резорбции. Создается отрицательный костный баланс, рассасывание кости опережает образование новой кости, что приводит к генерализованному остеопорозу.

Дефицит инсулина снижает выработку остеобластами коллагена и щелочной фосфатазы, необходимых для образования костного матрикса и его минерализации. Уменьшается стимуляция остеобластов, опосредованная инсулиноподобными и другими факторами роста. Прямое влияние высокой концентрации глюкозы усиливает резорбцию кости остеокласта-

ми. Больные сахарным диабетом 1-го типа с абсолютной инсулиновой недостаточностью даже в молодом возрасте более подвержены остеопорозу, нежели больные инсулиннезависимым сахарным диабетом 2-го типа.

Таким образом, нарушения гормонального баланса, прежде всего уровня эстрогенов, тироксина, глюкокортикоидов, инсулина, могут быть причиной нарушения метаболизма костной ткани с выраженным преобладанием процессов ее резорбции, вследствие чего развиваются остеопения и остеопороз.

6.2.1.2. Соматическая патология

Факторами риска снижения МПКТ и риска переломов костей у женщин могут быть **нервная анорексия** (нарушение питания вследствие болезненного неприятия пищи), **ревматические заболевания**, различные болезни **желудка, кишечника, печени, поджелудочной железы**, при которых нарушаются всасывание и обмен витамина D и его метаболитов, отмечается мальабсорбция ионов кальция. Дефицит МПКТ особенно часто развивается при **заболеваниях почек** (почечный синдром Фанкони, ренальный тубулярный ацидоз), при которых отмечается дефект транспорта и нарушения реабсорбции ионов, в результате чего появляются почечная остеопатия или остеодистрофия.

6.2.1.3. Неблагоприятные факторы образа жизни

Значительное влияние на формирование костной ткани и темпы костных потерь оказывает образ жизни, включая **курение, употребление алкоголя и физическую активность**. Физические упражнения увеличивают костную массу и размеры кости. Снижение физической активности приводит к развитию остеопороза, что убедительно показано на примере гипокинезии в условиях космической гравитации. Риск развития остеопороза возрастает на 10–30% за каждые 10 лет курения за счет выраженного гипоэстрогенного действия никотина. Алкоголь вызывает развитие остеопении за счет синдрома мальабсорбции, нарушения питания. Факторами риска остеопороза являются недостаточное потребление продуктов, содержащих кальций, витамин D, цинк, магний, калий, сниженное содержание фтора в питьевой воде, избыточное потребление белков и злаков (способствуют усилению кальциурии и вторично-отрицательного кальциевого баланса). Отрицательно влияет на костный обмен кофеин (2 чашки кофе в день приводят к ежедневной потере 6 мг кальция). К факторам риска возникновения дефицита кост-

ной массы относится прием ряда лекарственных препаратов. В частности, изменения костного метаболизма и нарушения обмена витамина D наблюдаются при приеме ряда противосудорожных средств. Помимо глюкокортикоидов, остеопороз может быть спровоцирован длительным применением гепарина, анальгетиков фенацетинового ряда и антагонистов альдостерона (верошпирон).

6.2.2. Генетические факторы

Изучение МПКТ у родственников и у близнецов показывает, что процессы **костного ремоделирования** примерно на 75–85 % находятся под генетическим контролем. При этом уровень конкордантности (совпадения) по наличию остеопороза у однояйцевых близнецов вдвое больше по сравнению с разнояйцевыми. В настоящее время идентифицировано свыше 250 генов, участвующих в метаболизме костной ткани [404].

6.2.2.1. Генные сети

Остеогенез и процессы костного ремоделирования в целом являются результатом согласованной работы многих генов разных локальных и интегральных генных сетей организма. Достаточно условно можно выделить пять таких сетей (табл. 6.2.1). Генная сеть регуляции гомеостаза кальция (1), локальная генная сеть цитокинов, ростовых факторов и их рецепторов (2); локальная сеть генов, белковые продукты которых формируют матрикс костной ткани (3), генная сеть метаболизма остеокластов и остеобластов — клеток, разрушающих и формирующих костную ткань соответственно (4), интегральная генная сеть гормональной регуляции метаболизма костной ткани (5).

Считается, что остеопороз является результатом недостаточной или, скорее, несбалансированной работы соответствующих генов-кандидатов, общее число которых на данный момент превышает три десятка. Роль каждого из них в этиологии заболевания определена недостаточно четко, а о связи большинства из них с остеопорозом имеются только единичные сообщения.

Между тем анализ генетических факторов, влияющих на плотность костей, имеет большое значение для понимания патогенетических основ остеопороза. Идентификация генов-кандидатов, изучение молекулярных и физиологических механизмов действия их белковых продуктов важно для выработки оптимальной стратегии профилактики и терапии этого тяжелого инвалидизирующего заболевания.

Таблица 6.2.1

Локальные и интегральные генные сети, регулирующие процессы остеогенеза и костного ремоделирования

Генные сети	Название гена	OMIM №	Символ гена	Локализация гена
Гомеостаза кальция	Рецептор витамина D	601769	<i>VDR</i>	12q12-q14
	Кальцитонин	114130	<i>CALCA</i>	11p15.2-p15.1
	Рецептор кальцитонина	114131	<i>CALCR</i>	7q21.3
	Кальций-чувствительный рецептор	601199	<i>CASR</i>	3q21-24
	Паратиреоидный гормон	168450	<i>PTH</i>	11p15.3-p15.1
Метаболизма и регуляции остеобластов и остеокластов	Интерлейкин-6	147620	<i>IL6</i>	7p21
	Рецептор антагониста интерлейкина 1	147679	<i>IL1RN</i>	2q14.2
	Фактор роста фибробластов β 1	190180	<i>TGFB1</i>	19q13.1-13.3
	α 2-HS-гликопротеин	138680	<i>AHSG</i>	3q27
	Инсулинзависимый фактор роста 1	147440	<i>IGF1</i>	12q22-q24.1
Гормональной дисфункции	Рецептор эстрогена α	133430	<i>ER1</i>	6q25.1
	Рецептор андрогена	313700	<i>AR</i>	Xq11-q12
	Ароматаза (цитохром P450)	107910	<i>CYP19A1</i>	15q21.1
Матрикса костной ткани	Коллаген 1-го типа α 1	120150	<i>COL1A1</i>	17q21.31-q22.05
	Коллаген 1-го типа α 2	120160	<i>COL1A2</i>	7q21.3 — q22.1
	Коллаген 2-го типа α 1	120140	<i>COL2A1</i>	12q13.11-q13.2
	Коллагеназа	120353	<i>MMP1</i>	11q22-q23
	Остеокальцин	112260	<i>BGLAP</i>	1q25-q31
	Катепсин К	601105	<i>CTSK</i>	1q21
Липопротеинового обмена	Аполипопротеин Е	107741	<i>APOE</i>	19q13.2
OMIM = Online Mendelian Inheritance in Man database (см. URL: http://www.ncbi.nlm.gov/omim/)				

Наиболее интенсивные исследования в последние годы были посвящены изучению полиморфизма **генов рецепторов витамина D (*VDR*)** [308, 437, 604, 807], **кальцитонина (*CTR*)** [250, 682, 346] и

эстрогена- α (*ER*) [291, 388], а также полиморфизма генов основных белков матрикса костной ткани — α_1 и α_2 цепей проколлагена 1-го типа (*COL1A1*, *COL1A2*) [228, 412, 492, 551, 562, 567, 589, 704, 708] и остеокальцина (*BGP*) [233, 644].

6.2.2.2. Рецептор кальцитонина (*CALCR*)

Кальцитонин (КТ) — пептидный гормон, секретируется парафолликулярными клетками щитовидной железы в ответ на увеличение содержания ионов Са в плазме крови. КТ снижает концентрацию ионов Са в сыворотке, предотвращая гиперкальциемию, что приводит к снижению активности остеокластов и уменьшению вымывания Са из костного матрикса. КТ ингибирует образование новых остеокластов и снижает реабсорбцию Са в почечных канальцах. Эффекты КТ обусловлены его воздействием на специфические кальцитониновые рецепторы клетки, близкие по структуре рецепторам паратгормона и секретина. Белок рецептора КТ состоит из 490 аминокислот и имеет массу 3,4 кДа.

Ген рецептора кальцитонина (*CALCR*) локализован на длинном плече хромосомы 7 (7q21.3) и имеет *AluI* полиморфизм в позиции 1377, вследствие которого в 463 позиции белка Calcr может находиться либо лейцин (наличие цитозина — С), либо аминокислота пролин (наличие тимина — Т). Высказано предположение о возможной роли данной мутации в регуляции биологической активности КТ. Действительно, у женщин с генотипом *T/T* МПКТ позвонков достоверно ниже, чем у женщин с генотипами *T/C* (гетерозигот) и *C/C* (гомозигот по наличию лейцина в 463 положении белка Calcr). Установлено также, что частоты аллелей *T* и *C* и генотипов *T/T*, *T/C* и *C/C* в различных популяциях существенно варьируются. Так, в Японии частота *C*-аллеля достигает 90 % [250], в то время как в Италии она не превышает 42 % [682]. В исследовании 307 постменопаузальных женщин Италии показано, что у женщин с генотипом *TT* МПКТ позвонков достоверно ниже, чем у женщин с генотипами *TC* и *CC* [682].

Дальнейшие исследования показали, что переломы костей запястья или позвоночника, связанные с остеопорозом, достоверно реже встречаются у гетерозигот *T/C* по сравнению с гомозиготами (*T/T* или *C/C*). Это позволило предположить, что именно генотип *TC* является протективным фактором, способствующим сохранению МПКТ и защищающим организм от развития остеопороза [346].

Таблица 6.2.2

Частоты аллелей и генотипов по гену *CALCR* в популяции, у женщин постменопаузального периода и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой	Частоты генотипов, %			p
	T	C		TT	TC	CC	
Популяционная выборка (n = 84)	73,8 ± 3,9	26,2 ± 6,6	—	53,6	40,5	6,0	—
Больные тяжелым остеопорозом (n = 32)	84,4 ± 4,9	15,6 ± 11,5	2,9 p > 0,05	68,8	31,3	0,0	3,35 p > 0,05
Женщины постменопаузального периода (n = 105)	77,1 ± 3,3	22,9 ± 6,1	0,7 p > 0,05	56,2	41,9	1,9	2,15 p > 0,05

Согласно нашим исследованиям, частота *T*-аллеля гена *CALCR* у больных тяжелым остеопорозом в Северо-Западном регионе РФ составляет 84,4 ± 4,9%, у женщин постменопаузального периода — 77,1 ± 3,3% и достоверно не отличается от популяционной (73,8 ± 3,9%) (табл. 6.2.2).

Распределение частот генотипов *TT*, *TC* и *CC* гена *CALCR* в популяции Северо-Западного региона России также вполне соответствует закону Харди–Вайнберга ($p > 0,05$), что доказывает отсутствие избирательной селекции какого-нибудь исследованного аллеля или генотипа.

Распределение генотипов *TT*, *TC* и *CC* у больных тяжелым остеопорозом (68,8, 31,3 и 0,0% соответственно) отличалось от аналогичных популяционных показателей — 53,6, 40,5 и 6,0% ($p > 0,05$), причем генотип *CC* в выборке больных вообще не был выявлен. У женщин постменопаузального периода распределение генотипов достоверно не отличалось от популяционного (*TT* — 56,2%, *TC* — 41,9% и *CC* — 1,9%, табл. 6.2.2). Частота мутантного *T*-аллеля у женщин с быстрой потерей МПКТ в наших исследованиях достигала 80,5 ± 3,9% в сравнении с 72,0 ± 5,8% в группе с медленной потерей МПКТ ($p > 0,05$) (табл. 6.2.3).

Однако частоты *TT*, *TC* и *CC* генотипов у пациентов с быстрой потерей МПКТ достоверно отличались от популяционных (60,9, 39,1, 0% и 53,6, 40,5, 6% соответственно; $\chi^2 = 4,18$; $df = 2$, $p < 0,01$). При этом у женщин с быстрой потерей МПКТ отмечалось существенное увеличе-

Таблица 6.2.3

Частоты аллелей и генотипов по гену *CALCR* в популяции и в группах женщин постменопаузального периода с различной скоростью потери МПКТ

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой	Частоты генотипов, %			p
	T	C		TT	TC	CC	
Популяционная выборка (n = 84)	73,8±3,9	26,2±6,6	—	53,6	40,5	6,0	—
Женщины с быстрой потерей МПКТ (n = 32)	80,5±3,9	19,5±7,9	1,8 p>0,05	60,9	39,1	0,0	4,18 p<0,01
Женщины с медленной потерей МПКТ (n = 32)	72,0±5,8	28,0±9,4	0,1 p>0,05	48,8	46,3	4,9	0,4 p>0,05

ние частоты функционально неблагоприятного генотипа *TT* (60,9%), а генотип *CC* вообще не был зарегистрирован. В отличие от этого, частоты соответствующих генотипов у женщин с медленной потерей МПКТ составили: *TT* — 48,8%; *C/C* — 4,9% и в популяционной выборке 53,6 и 6% соответственно (табл. 6.2.3).

Таким образом, тестирование *Alu* полиморфизма гена рецептора кальцитонина, проведенное в разных лабораториях и на разных группах пациентов, свидетельствует о наличии ассоциации генотипа *T/T* с ускоренной потерей МПКТ и, соответственно, позволяет рассматривать его как фактор, детерминирующий наследственную предрасположенность к остеопорозу.

6.2.2.3. Коллаген 1-го типа (*COL1A1* и *COL1A2*)

Белок коллаген тип 1 (*Colla1*) состоит из двух цепей проколлагена α_1 и одной проколлагена α_2 . Их структура кодируется соответственно двумя близкими по структуре генами *COL1A1* и *COL1A2*. Ген *COL1A1* расположен на длинном плече хромосомы 17 (17q21.31–q22.05), ген *COL1A2* — на длинном плече хромосомы 7 (7q21.3–q22.1).

Коллаген тип 1 — наиболее распространенный белок матрикса соединительной (до 25–30%) и костной (90%) тканей. Он придает механическую прочность и выполняет морфогенетическую функцию, влияя

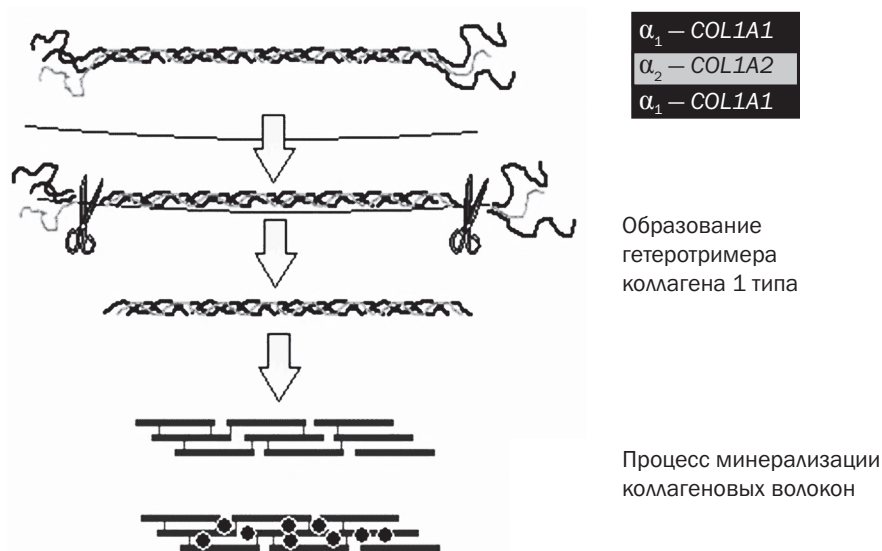


Рис. 6.2.2. Формирование коллагенового волокна

на рост, миграцию и дифференцировку клеток, определяет их секреторную и синтетическую активность.

Молекулы коллагена тип 1 состоят из трех спирально скрученных полипептидных цепей — двух α_1 и одной α_2 . Коллаген тип 1 относится к фибриллярным, или интерстициальным белкам. Его фибриллы входят в состав соединительной и костной тканей. Помимо остеобластов, коллаген тип 1 вырабатывают также фибробласты, хондробласты и ретикулярные клетки. В гене *COL1A1* идентифицировано несколько вариантов полиморфизма, однако ассоциация с остеопорозом показана только для G→T полиморфизма (в положении +1245) регуляторной области гена *COL1A1* (интрон 1) в сайте узнавания фактора транскрипции Sp1 [704]. В норме при формировании коллагенового волокна происходит объединение 2 цепей проколлагена α_1 и одной цепи проколлагена α_2 в спиральный гетеротример (см. рис. 6.2.2).

При нарушении нормального соотношения α_1 и α_2 цепей (2:1) структура коллагенового волокна нарушается. Вместо обычных гетеротримеров возникают гомотримеры — молекулы коллагена, состоящие из трех цепей проколлагена α_1 . Это сопровождается нарушением процессов минерализации костного матрикса. Именно таким эффектом обладает G→T полиморфизм в промоторе гена *COL1A1*.

Промоторная область гена *COL1A1*, содержащая функционально неполноценный *T(s)* аллель, имеет в 1,8 раза большее сродство (аффинность) к связыванию транскрипционного фактора Sp1 по сравнению с нормальным *G(S)* аллелем [492]. Результатом наличия *s*-аллеля является повышенная экспрессия гена *COL1A1* и синтез избыточного числа цепей проколлагена α_1 . Это приводит к появлению функционально неполноценных гомотримерных коллагеновых волокон. При этом МПКТ у гетерозигот *G/T* (*Ss* генотип) ниже, чем у гомозигот *G/G* (*SS*), а у гомозигот *T/T* (*ss*) еще более низкая, чем у индивидов *Ss* и *SS*. В популяции Великобритании генотип (*Ss*) зарегистрирован вдвое чаще у больных с тяжелым остеопорозом по сравнению с контрольной группой (54 и 27% соответственно) [704]. Эти результаты подтвердились также в работе, проведенной на выборке из 1778 женщин с тяжелым постменопаузальным остеопорозом. МПКТ в позвоночнике и в бедренной кости у пациентов с генотипом *Ss* оказалась на 2%, а с генотипом *ss* — на 4% ниже, чем у женщин с генотипом *SS* [708].

Сделан вывод о важной функциональной значимости полиморфизма *G*→*T* в сайте связывания транскрипционного фактора Sp1 регуляторной области гена *COL1A1* и его ассоциации с остеопорозом [228]. Его определение может иметь большое практическое значение в досимптоматической идентификации индивидов с повышенным риском развития остеопороза [562, 737]. В пользу этого утверждения свидетельствуют и многочисленные исследования, выполненные в Австрии, Чехии, Испании.

Проведенные нами исследования 74 женщин с клиническими признаками тяжелого остеопороза, 124 женщин постменопаузального периода с признаками остеопороза, выявленными при денситометрическом анализе, и 174 здоровых индивидов, не состоящих в родстве, показали, что у больных с клинически выраженной формой остеопороза частота генетически неполноценного аллеля *s* в 3 раза превышает его частоту в популяции Северо-Западного региона (табл. 6.2.4).

В то же время у женщин с признаками остеопороза только по результатам денситометрического анализа МПКТ частоты этих аллелей, хотя и были несколько выше, но статистически не отличались от контрольных. Наиболее убедительные результаты о наличии четкой корреляции данного полиморфизма с остеопорозом получены при сравнении распределения генотипов. Так, частота генотипов *SS*, *Ss* и *ss* у женщин с признаками постменопаузального остеопороза составила

Таблица 6.2.4

Частоты аллелей и генотипов гена *COL1A1* в популяции, в группе женщин постменопаузального периода и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой	Частоты генотипов, %			p
	<i>S</i>	<i>s</i>		<i>SS</i>	<i>Ss</i>	<i>ss</i>	
Популяционная выборка (n = 174)	82,5±2,2	17,5±4,9	—	67,8	29,3	2,9	—
Больные тяжелым остеопорозом (n = 74)	50,0±5,9	50,0±5,9	53,6 p < 0,01	32,9	34,3	32,9	50,0 p < 0,01
Женщины с признаками постменопаузального остеопороза (n = 124)	79,0±2,9	21,0±5,7	1,1 p > 0,05	69,4	19,4	11,3	10,9 p < 0,01

69,4, 19,4 и 11,3% соответственно и достоверно ($\chi^2 = 10$, $df = 2$, $p < 0,01$) отличалась от таковых в популяции (группа 3) (67,8, 29,3 и 2,9%). Еще более высокая корреляция отмечена в группе женщин с тяжелым остеопорозом, среди которых частота пациентов с генотипом *ss* достигала 32,9% и более, что в 10 раз превышает таковую в контроле [9]. Достоверная ассоциация *s*-аллеля с остеопорозом констатирована и в работах других отечественных авторов [139].

Вместе с тем нельзя не отметить, что результаты генетического тестирования полиморфизма G→T в сайте связывания транскрипционного фактора Sp1 регуляторной области гена *COL1A1* далеко не всегда однозначны. В некоторых европейских популяциях, а также у женщин постменопаузального возраста в Корее и Японии не выявлено связи данного полиморфизма с массой кости и МПКТ [412, 551, 567].

Обстоятельные популяционные исследования и результаты мета-анализа, однако, подтверждают наличие такой ассоциации. Так, в 2001 г. группой английских авторов была предпринята попытка суммировать имеющиеся данные относительно влияния аллелей гена *COL1A1* на МПКТ в разных частях скелета [358]. Был сделан вывод о наличии четкой ассоциации *s*-аллеля гена *COL1A1* со скоростью снижения МПКТ (до 2% в год). Отмечено также, что потерю МПКТ в группе

генетического риска можно существенно замедлить и даже полностью нивелировать с помощью дополнительных доз витамина D и препаратов кальция. Полученные результаты позволили авторам рекомендовать Министерству здравоохранения Великобритании включить, наряду с денситометрией костей, генотипирование данного полиморфизма гена *COL1A1* в программу обязательного тестирования наследственной предрасположенности к остеопорозу женщин менопаузального и постменопаузального периодов [358].

Мета-анализ 22 работ также подтвердил наличие достоверной ассоциации мутантного *s*-аллеля гена *COL1A1* с риском возникновения переломов [398]. Вместе с тем в данном обзоре делается вывод, что наличие только одного *s*-аллеля — важное, но еще недостаточное условие для снижения МПКТ и последующего развития остеопороза. Различия популяционных частот неблагоприятного *s*-аллеля, расовые и этнические особенности диеты в отношении потребления с пищей солей Ca, витамина D, а также другие экзогенные и эндогенные факторы играют существенную роль в определении уровня МПКТ, частоте остеопороза и связанных с ним переломов.

Сходные данные получены и при мета-анализе 26 работ, в которых в общей сложности было проанализировано 7849 человек [589]. Авторы подтвердили гипотезу о том, что Sp1 полиморфизм гена *COL1A1* является клинически значимым маркером предрасположенности к переломам, связанным с остеопорозом, а неблагоприятный генотип *ss* ассоциирован с переломами за счет механизмов, которые в значительной степени не зависимы от МПКТ.

Сравнительно недавно в гене *COL1A1* были идентифицированы еще два полиморфизма PCOL1 (делеция T в положении –1663) и PCOL2 (замена G→T в положении –1997) в промоторной области гена. Предварительные данные показали, что GG генотип *PCOL2* ассоциирован с низким уровнем МПКТ, а полиморфизм PCOL1 сцеплен с полиморфизмом Sp1 [780]. Таким образом, оба полиморфизма (PCOL1 и PCOL2), располагаясь в важной регуляторной области гена, влияют на уровень его экспрессии подобно ранее описанному полиморфизму G–T +1245.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о важной роли G–T полиморфизма (+1245) гена *COL1A1* как генетического маркера наследственной предрасположенности к остеопении и остеопорозу. Риск остеопороза возрастает при наличии аллеля *s* и становится особенно значимым у лиц с генотипом *ss*.

6.2.2.4. Рецептор витамина D (VDR)

Ген *VDR* расположен на коротком плече хромосомы 12 (12p12-q14). Первичный продукт трансляции гена *VDR*, белок рецептора витамина D (РВД), состоит из 467 аминокислот и является внутриядерным рецептором, относящимся к группе ДНК-связывающих белков.

Молекула РВД состоит из трех функциональных доменов. Первый из них, С1, — гидрофильный домен эволюционно наиболее консервативный, имеет большое сходство с ядерными рецепторами. Этот домен, расположенный на N-конце РВД, содержит 70 аминокислот, богат цистеином, лизином и аргинином. В функционально активной молекуле РВД первые 8 цистеинов связаны с двумя атомами цинка и образуют структуру «цинковых пальцев», которая, взаимодействуя с ДНК, может регулировать работу многих генов-мишеней. Мутации, приводящие к замене любого из этих цистеинов, блокируют связывание РВД со специфической последовательностью ДНК, прерывая, таким образом, РВД-зависимую активацию генов-мишеней. Известно, что мутации в данном гене чаще всего несовместимы с жизнью или могут приводить к редкому моногенному заболеванию — витамин-D-резистентному рахиту [146].

РВД играет роль посредника в передаче биологического действия **кальцитриола (1,25-дигидроксивитамина D₃ — 1 α ,25(OH)₂D₃) — активной формы витамина D**, которой принадлежит ключевая роль в метаболизме костной ткани. **Кальцитриол** определяет уровень метаболизма кальция в костях, процессы ремоделирования костной ткани и продукцию паратиреоидного гормона. РВД является посредником в передаче биологического сигнала 1 α ,25(OH)₂D₃ кальцитриола (рис. 6.2.3).

РВД, как и другие ядерные рецепторы, регулирует транскрипцию генов гормональной зависимости, связываясь с их специфическими регуляторными последовательностями, получившими название **элементов ответа витамина D (ЭОВД)**. В настоящее время обнаружено несколько генов, находящихся под контролем кальцитриола. Одним из генов, содержащих ЭОВД, является ген **остеокальцина** — самого распространенного неколлагенового белка кости.

Витамин D и его активные метаболиты являются главными компонентами гормональной системы, регулирующей фосфорно-кальциевый обмен. Они участвуют в процессах минерализации костной ткани, в поддержании гомеостаза кальция и, наконец, оказывают непосредственное влияние на процессы ремоделирования через ядерный рецептор витамина D (РВД).

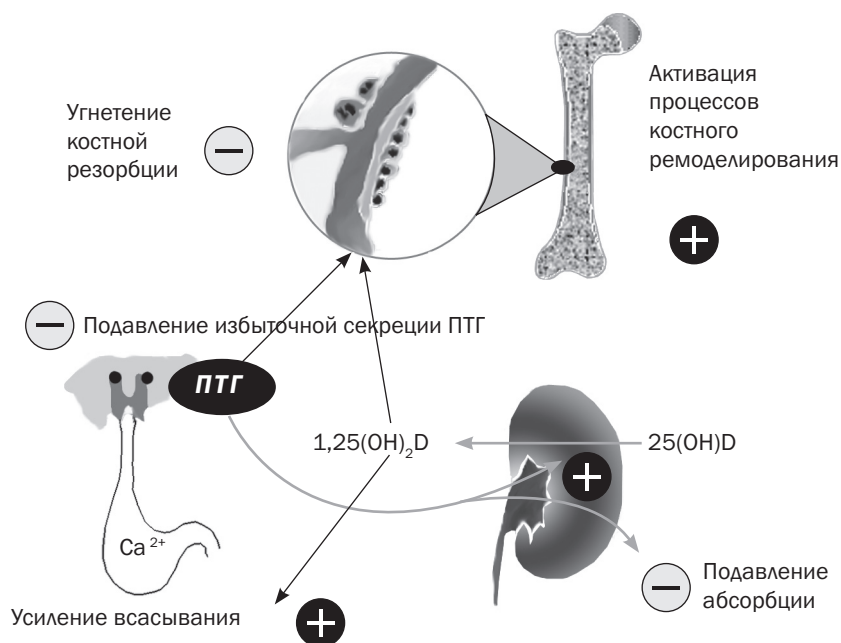


Рис. 6.2.3. Функциональная активность кальцитриола

ПТГ — паратиреоидный гормон

В гене *VDR* идентифицированы несколько различных мутаций (полиморфизма). К ним относятся однонуклеотидные замены, которые можно идентифицировать с помощью соответствующих ферментов — **эндонуклеаз рестрикции**, таких как FokI, ApaI, BsmI, Tru9I и TaqI. В 3'-некодируемой части гена также выявлен микросателлитный полиморфизм (poly-A), а в его промоторной области — полиморфизм Cdx2 (рис. 6.2.4).

Сайты полиморфизма Tru9I, BsmI и ApaI локализованы в 8 интроне гена *VDR* и тесно сцеплены между собой (у лиц с *TT* генотипом почти в 94% случаев наблюдаются *bb* и *aa* генотипы). Полиморфизм, локализованный в позиции 61968 9-го экзона, обусловлен заменой нуклеотида Т на С, что создает сайт рестрикции для эндонуклеазы TaqI. Данная замена в кодоне является функционально «молчащей», так как в связи с «вырожденностью» генетического кода она не приводит к замене аминокислоты лейцина в белке.

Наибольшее число исследований посвящено анализу так называемого BsmI полиморфизма и тесно (неравновесно) сцепленного с ним

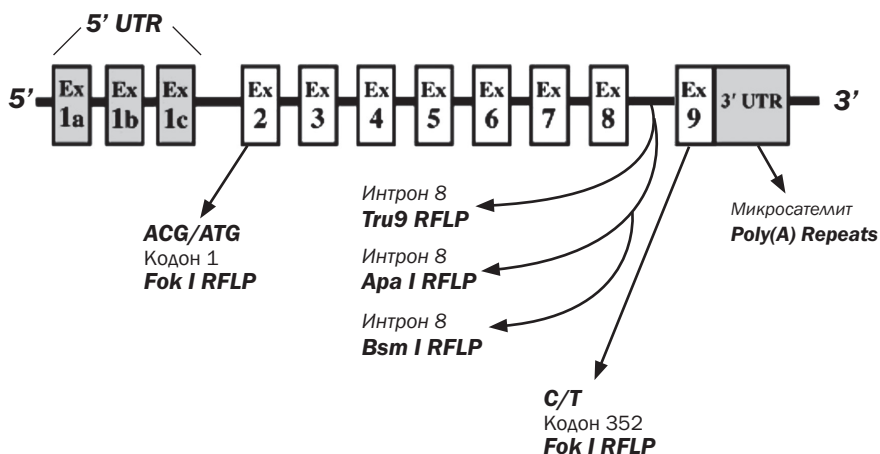


Рис. 6.2.4. Полиморфизм гена *VDR* [459]

TaqI полиморфизма, выявляемых соответственно эндонуклеазами *Bsm* и *TaqI*. Полиморфизм *BsmI* локализован в неактивной части гена (интрон 7), а полиморфизм *TaqI* — в его активной, транскрибируемой и транслируемой области (экзон 9). В последнем случае в белке РВД наблюдается замена аминокислоты изолейцина на метионин.

Результаты многочисленных исследований по изучению влияния аллельных вариантов гена *VDR* на МПКТ и их ассоциацию с риском развития остеопороза неоднозначны. Наиболее детально изучены в этом плане полиморфные сайты *BsmI* (*TaqI*) и *FokI*. Уже в первых работах было показано что генотип *BB* (аллель *B* обозначает отсутствие сайта рестрикции для эндонуклеазы *BsmI*) ассоциирован с низкой МПКТ. У лиц с генотипом *BB* МПКТ позвоночника снижается до критического уровня через 18,4 лет после менопаузы, у лиц с генотипом *Bb* — через 22 года, а у женщин с генотипом *bb* — только через 29 лет. В среднем «критический уровень» МПКТ у женщин с генотипом *BB* приходится на 65 лет, с генотипом *Bb* — на 69 и с генотипом *bb* — на 76 лет. Эти результаты хорошо соответствуют показателям уровня кальция в сыворотке крови у женщин этих групп: (134 ± 42 pM; 104 ± 30 pM и 99 ± 40 pM соответственно) [604]. Отмечено также, что корреляция по показателям МПКТ у однояйцевых близнецов вдвое выше, чем у разнояйцевых. Эти данные были подтверждены работами других авторов [517].

В последующих исследованиях, однако, такая ассоциация была не столь очевидной [793] или вообще не обнаруживалась [337, 447,

795]. Слабая ассоциация данного полиморфизма с МПКТ и остеопорозом была отмечена и при мета-анализе 16 работ, выполненных на женщинах постменопаузального периода из разных стран [368]. Согласно этим данным, у женщин с *BB* генотипом МПКТ снижена только на 1,5–2,5 % в сравнении с нормой (женщины с *bb* генотипом), что на порядок меньше в сравнении с 12 %, отмеченными ранее в работе Н. Моррисона и соавт. [604].

Предполагалось, что расхождение данных разных авторов связано с малыми по объему выборками пациентов, различиями этнической и расовой принадлежности, отсутствием унифицированных клинических критериев отбора групп больных. В дальнейших исследованиях связь МПКТ с мутациями *VDR* гена анализировали с учетом этих особенностей и с использованием более четких критериев фенотипических проявлений аллельных вариантов этого гена.

В частности, установлена корреляция различных генотипов и гаплотипов по изученному полиморфизму гена *VDR* с эффективностью абсорбции ионов *Ca* из кишечника. Абсорбция достоверно снижена у лиц с генотипами *BB*, *AA* и *tt* в сравнении с таковой при генотипах *bb*, *aa* и *TT* [431].

Сравнительный анализ связи аллельных вариантов гена *VDR* с интенсивностью обмена костной ткани у женщин постменопаузального периода с выраженными различиями по МПКТ выявил высокие уровни маркеров костного обмена у женщин *BB* генотипа с низкой МПКТ. В то же время у женщин с высоким уровнем МПКТ распределение генотипов практически не отличалось от популяционного [792].

Нами проведено исследование особенностей аллельных частот *TaqI* полиморфизма *BsmI/TaqI* у населения Северо-Западного региона России, преимущественно Санкт-Петербурга, а также у больных остеопорозом [9]. Исследованы 74 женщины с клиническими признаками тяжелого остеопороза, 124 женщины постменопаузального периода с признаками остеопороза, выявленными при денситометрическом анализе, и 174 здоровых индивида, не состоящих в родстве. Минеральную плотность костной ткани определяли методом двухэнергетической рентгеновской денситометрии (DEXA) на аппарате QDR 4500C фирмы Hologic (США) на базе МСЧ № 122 СПб. Диагностику остеопороза осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ (1994) по Т-критерию, то есть в стандартных отклонениях (SD) от нормативных показателей пиковой костной массы здоровых женщин. Величина SD до 1 расценивалась как

Таблица 6.2.5

Частоты аллелей и генотипов по гену *VDR* в популяции, в группе женщин постменопаузального периода и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой	Частоты генотипов, %			p
	<i>T</i>	<i>t</i>		<i>TT</i>	<i>Tt</i>	<i>tt</i>	
Популяционная выборка (n = 174)	67,4±3,4	32,6±4,9	—	45,7	43,5	10,9	—
Больные тяжелым остеопорозом (n = 74)	48,6±6,1	51,4±5,9	13,8 p < 0,01	18,6	60,0	21,4	15,5 p < 0,01
Женщины постменопаузального периода (n = 124)	64,1±3,8	35,9±5,1	0,6 p>0,05	38,7	50,8	10,5	1,5 p>0,05

норма, от 1 до 2,5 SD — как остеопения, выше 2,5 SD — как остеопороз. Т-критерий в зоне L1–L4 поясничной области позвоночника у пациенток с хирургической менопаузой составил $-3,13 + 0,74$ SD, а у женщин с естественной менопаузой — $-2,74 + 0,81$ SD. Для статистических расчетов использовали абсолютные значения МПКТ в г/см².

Результаты генетического тестирования свидетельствуют о том, что у больных с клинически выраженной формой остеопороза частота функционально неполноценного *t*-аллеля в 2 раза превышает таковую в популяции Северо-Западного региона (табл. 6.2.5). В то же время у женщин с остеопенией частота *t*-аллеля, хотя и была несколько выше, но статистически не отличалась от контроля. Убедительные результаты о наличии ассоциации данного полиморфизма с остеопорозом получены при анализе распределения генотипов. Установлено, что частота *t* гомозигот в Северо-Западном регионе России составляет около 5%, что почти в 4 раза меньше, таковой у жителей Великобритании (19,5%) [9].

В подгруппах больных с тяжелым постменопаузальным остеопорозом частота *tt*-генотипа вдвое превысила контрольный уровень и составила 21% в сравнении с 10% в популяционной выборке. Интересно отметить, что у больных с другими вариантами остеопороза (детский; вызванный нарушениями секреции эстрогенов) соотношения аллелей гена *VDR* статистически не отличались от контроля.

Таким образом, для популяции Северо-Западного региона России полученные результаты доказывают четкую корреляцию остеопороза с наличием функционально неполноценного аллеля *t* гена *VDR*.

Достоверная ассоциация потери МПКТ обнаружена и для другого полиморфного сайта гена *VDR*, выявляемого эндонуклеазой *FokI* (2-й экзон, сайт инициации трансляции, аллель *F* — норма, аллель *f* — белок *Vdr*, укороченный на 3 аминокислоты (рис. 6.2.4). У японских [240] и латиноамериканских женщин [757] установлена связь *f*-аллеля с быстрой потерей МПКТ. Женщины с *ff*-генотипом на 12,8% чаще, чем с *FF*-генотипом, имели низкие значения МПКТ. Уровень маркера костной резорбции у женщин с *ff*-генотипом оказался на 33,5% выше по сравнению с женщинами с *FF*-генотипом [447].

Эти наблюдения, однако, не были подтверждены другими исследователями. Вместе с тем имеются данные, свидетельствующие о достоверном снижении абсорбции ионов *Ca* у детей пубертатного возраста с *ff*-генотипом [794].

Согласно другим авторам [431], у женщин с низкими значениями МПКТ выявлено статистически значимое преобладание *FF*-генотипа. Достоверная ассоциация *FF*-генотипа со снижением МПКТ и с патологическими переломами показана на небольшой группе пациентов (57 человек) Северо-Западного региона России и Санкт-Петербурга [138]. У больных тяжелой формой остеопороза частоты *F*-аллеля и *FF*-генотипа гена *VDR* составили 64 и 38,6% соответственно и достоверно отличались от таковых в контрольной группе — 50,0 и 18,8% соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, у женщин разных этнических групп фенотипический эффект одного и того же аллеля гена *VDR* может быть совершенно различным и даже противоположным по своему конечному результату.

Противоречивые результаты о влиянии на МПКТ получены и в отношении нового полиморфизма гена *VDR* в сайте связывания транскрипционного фактора *Cdx-2* (замена *A*→*G* в (–3731) положении от сайта инициации транскрипции) [240]. Было показано, что МПКТ в поясничном отделе позвоночника у пациенток с генотипом *Cdx-AA* значительно выше, чем у женщин с генотипом *Cdx-GG*. Высказано предположение, что данный полиморфизм влияет на МПКТ путем прямой регуляции активности рецепторов к витамину *D* в клетках кишечника. Ассоциация данного полиморфизма с показателями МПКТ была установлена для женщин Великобритании [358], но не подтвердилась при изучении *Cdx-2* полиморфизма у корейских женщин [555].

Таким образом, в силу многих причин как объективного, так и субъективного характера, сведения о влиянии уже известных аллельных вариантов гена *VDR* на состояние МПКТ и развитие остеопороза весьма неоднозначны. Особого внимания в связи с этим заслуживают данные мета-анализа, полученные путем обобщения результатов всего массива единичных разрозненных наблюдений.

Один из таких мета-анализов включал 75 статей и тезисов, опубликованных до января 1997 года [743]. В 22 из 67 работ, где исследовали МПКТ позвоночника, и 22 из 51 с исследованиями МПКТ бедра была выявлена достоверная положительная ассоциация аллелей *b*, *a*, *T* или *F* соответствующих вариантов полиморфизма гена *VDR* с одним из следующих позитивных показателей состояния КМ: высокая МПКТ, высокий уровень абсорбции кальция, низкая скорость потери МПКТ или костного обмена, низкая частота переломов или остеопороза.

Мета-анализ 2004 года результатов 39 работ за 1994–2001 годы подтвердил наличие ассоциации между BsmI полиморфизмом гена *VDR* и состоянием МПКТ поясничного отдела позвоночника [590]. У женщин постменопаузального периода с *B/B* генотипом средние показатели МПКТ были ниже на 0,022 г/см² по сравнению с индивидами с генотипами *B/b* или *b/b*. Высказано предположение, что отчетливый эффект этого полиморфизма проявляется только в тех случаях, в которых влияние негативных окружающих факторов сведено к минимуму. При достаточном употреблении кальция эффект воздействия неблагоприятных аллелей гена *VDR* на поддержание МПКТ нивелируется [590]. Следовательно, ассоциация МПКТ с геном *VDR* существует, но ее присутствие в значительной степени модифицируется различными внешними факторами.

Таким образом, анализ корреляции аллельных вариантов трех генов, несомненно сцепленных с метаболизмом костной ткани, рецептора витамина D (*VDR*), рецептора кальцитонина (*CALCR*) и коллагена тип 1 (*COL1A1*) свидетельствует о том, что функционально неполноценные аллели этих генов действительно ассоциированы с потерей МПКТ, остеопенией и остеопорозом. Однако такая корреляция выражена не всегда четко. Ее проявление зависит от популяционных, этнических и расовых особенностей, географических условий, качества питания и образа жизни. Из этого следует, что тестированию данных генетических маркеров с целью выявления женщин групп высокого риска постменопаузального остеопороза должны предшествовать тщательные исследования частот аллельного полиморфизма этих генов в репрезентативных

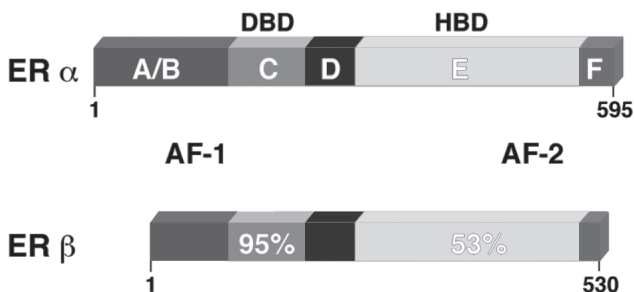


Рис. 6.2.5. Структура и функциональные домены эстрогеновых рецепторов [642]

по численности и клинически четко охарактеризованных группах больных остеопорозом и в адекватно подобранном контроле.

6.2.2.5. Эстрогеновый рецептор (ER)

Рецептор эстрогена относится к семейству внутриядерных рецепторов и подобно рецептору витамина D является, по сути, фактором транскрипции. Ген *ER* (*ER1* или *ERα*) локализован на 6 хромосоме (6q25–27), имеет размер 140 Кб и содержит 8 экзонов. До недавнего времени была известна только одна форма рецептора [724]. С открытием еще одного ER-рецептора [606], который кодируется другим геном, первоначальная форма обозначается как *ERα*, а другая — *ERβ*. Оба рецептора *ERα* и *ERβ* присутствуют в остеобластах и остеоцитах. Рецептор эстрогена *ERα* состоит из нескольких доменов, ответственных за активацию димеризации рецептора и связывание его с гормоном (лигандом) и с ДНК генов-мишеней (рис. 6.2.5). Эстрогеновые рецепторы состоят соответственно из 599 (*ERα*) и 530 (*ERβ*) аминокислот.

Высокая степень гомологии обоих рецепторов приходится на ДНК-связывающие домены (97%), в то время как их гормон-связывающие домены гомологичны только на 60%. Оба рецептора играют важную роль в процессах ремоделирования костной ткани (6.2.1.1).

Многочисленные варианты полиморфизма в гене *ERα*, многие из которых ассоциированы с риском развития переломов и высокой потерей МПКТ, представлены на рисунке 6.2.6.

Так, в промоторной области гена *ERα* выявлен микросателлитный ТА-повтор (ТА 10–27). Один из аллелей (ТА)12 обнаружил четкую ассоциацию сниженной МПКТ в позвонках с высокими показателями маркеров резорбции костной ткани у 144 японских женщин постменопаузального периода [291, 448].

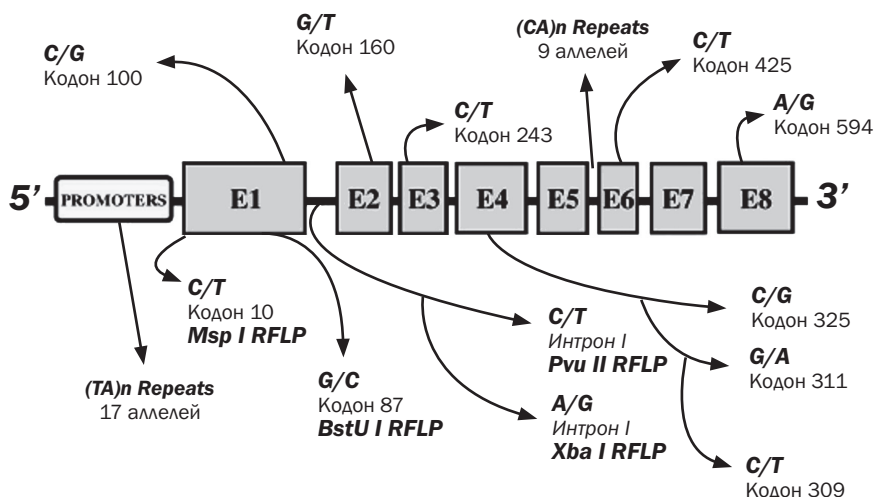


Рис. 6.2.6. Полиморфизм гена *ERα* [459]

Корреляция ТА — аллелей с низким числом повторов (11–18) с показателями МПКТ была подтверждена в Дании [563], Италии [417] и в Южном Китае [709]. Аллель с двадцатью ТА-повторами ассоциирован с риском развития переломов шейки бедра и поясничного отдела позвоночника у жителей Китая [709].

Самый известный полиморфизм гена *ERα* находится в 1-м интроне и соответствует сайтам рестрикции эндонуклеаз PvuII и XbaI [290]. Полиморфизм детально изучен многими исследователями разных стран. Однако полученные результаты весьма противоречивы. Окончательные выводы о прогностической значимости данного полиморфизма сделаны только в последнее время при анализе достаточно больших выборок пациентов и на основании мета-анализа многих разрозненных публикаций.

Мета-анализ 30 работ подтвердил существенное влияние XbaI, но не PvuII, полиморфизма гена *ERα* на потерю МПКТ шейки бедра и позвоночника [405]. Результаты исследования 900 постменопаузальных женщин Голландии 55–80 лет доказывают, что при наличии генотипа pp (PvuII-полиморфизм) менопауза начинается на 1,1 года раньше, чем в случае генотипа P/P. У женщин p/p генотипа отмечается высокий риск ранней хирургической менопаузы в случае гистерэктомии [411]. Прогностически неблагоприятным в плане остеопороза и потери МПКТ оказался x/x генотип (полиморфизм XbaI) и для женщин Санкт-Петербурга [139]. При генетическом анализе 634 пациенток в возрасте 55 лет

Таблица 6.2.6

Частоты аллелей и генотипов по гену *ER* (*Xba*I) в популяции, в группе женщин постменопаузального периода и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой	Частоты генотипов, %			p
	<i>X</i>	<i>x</i>		<i>XX</i>	<i>Xx</i>	<i>xx</i>	
Популяционная выборка (n = 127)	34,8±3,4	65,2±4,9	—	14,6	40,4	44,9	—
Больные тяжелым остеопорозом (n = 77)	22,2±5,1	77,8±4,9	10,8 p < 0,01	28,6	20,2	51,2	12,5 p < 0,01
Женщины постменопаузального периода (n = 178)	37,4±3,8	62,6±4,1	0,9 p > 0,05	14,1	46,5	39,4	1,2 p > 0,05

и старше установлен интересный факт, что неблагоприятное сочетание аллелей по гену *ERα* (*xp*-гаплотип) и по гену *VDR* (*ABt*-гаплотип) ассоциировано с высоким риском переломов [519].

В исследовании 2042 пожилых жителей Роттердама установлено, что гаплотип *px* (*Xba*I–*Pvu*II полиморфизм) зачастую сочетается с малым числом ТА-повторов в промоторной области генов и ассоциирован с низкими значениями МПКТ поясничного отдела [286]. При этом неблагоприятный полиморфизм в 5'-области гена *ERα* положительно коррелирует с риском перелома позвоночника только у пожилых женщин, но не у мужчин.

Генетическое исследование 945 шотландских постменопаузальных женщин, не получавших заместительную гормонотерапию (ЗГТ), позволило обнаружить, что у пациенток с *px*-гаплотипом и у гомозигот *px/px* ежегодные потери МПКТ шейки бедра на 14 % и на 22 % выше по сравнению с таковыми у женщин контрольной группы (без *px*-гаплотипа). Сделан вывод, что *px*-гаплотип может использоваться для выявления женщин групп высокого риска переломов шейки бедра [295].

Результаты наших исследований показывают достоверные отличия частоты генотипов *xx* и *pp* по гену *ER* в популяции по сравнению с таковыми в группе больных тяжелым остеопорозом (табл. 6.2.6 и 6.2.7).

Таким образом, анализ многочисленных литературных данных и собственных результатов свидетельствует о наличии ассоциации поли-

Таблица 6.2.7

Распределение генотипов и частот аллелей гена *ER* (PvuII) в популяции, в группе женщин постменопаузального периода и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой	Частоты генотипов, %			Наличие факторов риска остеопороза
	<i>P</i>	<i>p</i>		<i>PP</i>	<i>Pp</i>	<i>pp</i>	
Популяционная выборка (n = 127)	51,7±5,7	48,3±5,1	—	27,0	49,4	23,6	—
Больные тяжелым остеопорозом (n = 77)	22,9±3,1	77,1±1,9	18,8 p < 0,01	21,5	30,0	48,5	15,2 p < 0,01
Женщины постменопаузального периода (n = 178)	48,5±4,7	51,5±3,9	1,1 p>0,05	21,2	54,5	24,2	1,9 p>0,05

морфизма промоторной области гена *ERα* (низкокопийные ТА-повторы — 11–18) и неблагоприятных аллелей (*p* и *x*) рестрикционных полиморфных сайтов 1-го интрона гена *ERα* (XbaI–PvuII) с потерей МПКТ, остеопорозом и повышенной частотой переломов.

6.2.2.6. Остеокальцин

Ген остеокальцина (*BGP*, или *BGLAP*) локализован на 1 хромосоме (1q25–q31) и состоит из 4 экзонов [524]. Первичный белковый продукт трансляции имеет молекулярную массу 9000 Да, его «зрелая» форма — 5700 Да и состоит из 49 аминокислот. Ген *BGP* имеет 21 нуклеотидный ДНК-связывающий домен элементов ответа витамина D (ЭОВД) (см. 1.2.5). Остеокальцин (*BGLAP*, Bone GLA Protein) — основной неколлагеновый белок кости, ответственный за связывание кальция и гидроксипапатитов, является чувствительным маркером метаболизма костной ткани, синтезируется остеобластами и одонтобластами и состоит из 49 аминокислот. Предполагается участие остеокальцина в регуляции процессов костной резорбции. Его высокий уровень коррелирует с повышенной резорбцией кости, что позволяет рассматривать этот показатель как прогностический индикатор усиления заболевания костей.

В 1998 году описан полиморфизм промоторной области гена *BGP*, связанный с заменой С→Т в –298 положении. Полиморфизм выявляется с помощью рестриктазы HindIII, где *H*-аллель (отсутствие сайта

Таблица 6.2.8

Распределение генотипов и частот аллелей гена *BGP* в популяции, в группе женщин постменопаузального периода и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и число индивидов (n)	Частоты аллелей, %		Сравнение с популяционной выборкой χ^2 ; df = 1	Частоты генотипов, %			p
	<i>H</i>	<i>h</i>		<i>HH</i>	<i>Hh</i>	<i>hh</i>	
Популяционная выборка (n = 190)	18,5±6,5	81,5±2,7	—	3,7	29,6	66,7	—
Больные тяжелым остеопорозом (n = 65)	21,1±5,1	78,9±1,9	1,8 p>0,05	4,5	30,1	65,4	1,2 p>0,05
Женщины постменопаузального периода (n = 174)	20,8±6,7	79,2±2,9	1,1 p>0,05	3,8	34,0	62,3	1,9 p>0,05

рестрикции) указывает на наличие замены С на Т, а *h*-аллель — на ее отсутствие [233]. При исследовании 160 женщин постменопаузального периода установлено, что генотип *HH* ассоциирован с низким уровнем МПКТ и существенно увеличивает риск развития остеопороза [233].

Эти данные японских авторов впоследствии были подтверждены исследователями Швеции, показавшими, что у девочек 15–18 лет с *H*-аллелем гена *BGP* МПКТ на 15 % ниже, чем у их сверстниц с *h*-аллелем этого гена. Высказано предположение, что у индивидов с *H*-аллелем относительный риск развития остеопении в 4,5 раза выше популяционного [644]. Высокая корреляция *HindIII* полиморфизма гена *BGP* с низким уровнем МПКТ, установленная на большой выборке американцев европейского происхождения (248 мужчин и 382 женщин), позволила рекомендовать тестирование в качестве генетического маркера наследственной предрасположенности к низкой МПКТ в европейских популяциях. При исследовании 557 женщин 19–76 лет и 258 мужчин 50–80 лет в Китае подобной корреляции *HindIII* полиморфизма с показателями МПКТ не выявлено [336, 553].

В наших исследованиях также не было получено достоверных различий как в частотах генотипов, так и в частотах аллелей гена *BGP* в популяции по сравнению с таковыми в группах с тяжелым остеопорозом и женщин постменопаузального периода (табл. 6.2.8).

В какой мере подобные несовпадения результатов разных авторов определяются расовыми или популяционными особенностями аллельных частот исследуемого гена, модифицирующим эффектом внешних факторов или спецификой патогенеза остеопороза в разных странах — остается неизвестным и требует дальнейших исследований.

6.2.2.7. Другие возможные гены-кандидаты

Ранее отмечалось, что число генов, регулирующих процессы остеогенеза и костного ремоделирования, ориентировочно около 250. Их условно можно разнести по 5 основным генным сетям. При этом число уже известных и частично изученных генов-кандидатов превышает несколько десятков (см. табл. 6.2.1). Помимо основных генов-кандидатов, уже рассмотренных, следует упомянуть гены *TGFB1* и *IL6*. При изучении этих генов достоверной ассоциации их полиморфизма с МПКТ и с остеопорозом у женщин, больных остеопорозом, в сравнении с контрольной группой в популяции Северо-Западного региона России установлено не было [139].

Ассоциация с МПКТ изучена для многих других кандидатных генов, продукты которых вовлечены в метаболизм костной ткани, таких как ген $\alpha 2HS$ гликопротеина, интерлейкинов-1 и -6 (*IL1*, *IL6*), тканевого фактора роста (*TGFB*), инсулиноподобного фактора роста (*IGF1*), метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), рецептора β -блокаторов, гены рецепторов суперсемейства *TNF*, ароматазы, ингибитора 1с-циклинзависимой киназы и некоторых других.

Были также изучены некоторые некандидатные гены, включая *HLA DRB1* [490] и аполипопротеин E [271].

Множественный микросателлитный полиморфизм в пределах кандидатных генов или в непосредственной близости к ним был исследован на сцепление в определенных семьях, члены которых имели Z-score (показатель МПКТ) меньше, чем 2,5 [748].

Умеренная ассоциация МПКТ выявлена для шести других кандидатных генов: *EGF* (эпидермальный ростовой фактор), *IL4*, *COL2A1*, *VDR*, *COL1A1*. МПКТ лучевой кости сцеплена с микросателлитом локуса IL-6, локуса матричного белка [572]. Достоверное сцепление МПКТ лучевой кости обнаружено для микросателлитов, близких к гену *TNFA* [571]. Ген инсулиноподобного фактора роста (*IGF*) также рассматривается как кандидатный ген остеопороза, поскольку при мужском остеопорозе низкая концентрация инсулиноподобного фактора роста ИФР-1 коррелирует со специфическим аллелем (*IGF*) — 1 микросателлита с определенным

числом СА-повторов в 192 положении [284]. В другой работе [468] этот генотип ассоциировался с низким уровнем ИФР-1 в сыворотке у 85 мальчиков и девочек пубертатного возраста. Однако эти данные не были подтверждены в исследованиях японских авторов [520], а также при обследовании женщин, подростков и людей старше 20 лет [762]. Поиск новых кандидатных генов остеопороза продолжается.

6.2.2.8. Генетические аспекты профилактики

Как и любое другое заболевание, остеопороз легче предупредить, чем лечить. Профилактика этого грозного осложнения постменопаузального периода у женщин включает коррекцию диеты, образа жизни, использование соответствующих лекарств и витаминов, нормализующих метаболизм костной ткани, предотвращающих потерю солей Са и снижение МПКТ. Общие принципы профилактики этого тяжелого недуга подробно изложены в многочисленных публикациях, методических рекомендациях, руководствах для врачей [48]. Они постоянно рассматриваются в различных научно-практических медицинских журналах, прежде всего в журнале «Остеопороз и остеопения».

Сегодня представляется очевидным, что использование денситометрии позволяет провести раннюю диагностику остеопороза и начать превентивное лечение. Однако даже такой точный метод не позволяет заранее обнаружить лиц с наследственной предрасположенностью к этому заболеванию. Между тем их выявление задолго до существующих лабораторных и, тем более, до первых клинических проявлений могло бы иметь важное стратегическое значение для разработки эффективной индивидуальной досимптоматической профилактики остеопороза. Благодаря идентификации генов предрасположенности, контролирующих ключевые этапы остеогенеза и минерального обмена, впервые появилась реальная возможность в любом возрасте, задолго до менопаузы, выявлять женщин, имеющих риск остеопороза, и своевременно начинать его целенаправленную профилактику.

На основе мировых и собственных данных мы предлагаем оптимальный, с нашей точки зрения, алгоритм тестирования наследственной предрасположенности к низкой МПКТ, приводящей к остеопении и остеопорозу. Его основные этапы представлены на рисунке 6.2.7.

На первом этапе все женщины до наступления менопаузы, а в случае необходимости операции по удалению яичников — до операции, должны пройти генетическое тестирование по крайней мере



Рис. 6.2.7. Алгоритм обследования пациенток для диагностики остеопении

4 маркерных генов-кандидатов — **рецептора витамина D (*VDR*)**, **кальцитонина (*CTR*)**, **эстрогена- α (*ER α*)**, гена основного белка матрикса костной ткани и гена **остеокальцина (*BGP*)**, для которых уже установлена ассоциация неблагоприятных аллелей с низкой МПКТ и остеопорозом. Тестирование полиморфизма этих генов позволит задолго до начала заболевания выявить лиц высокого наследственного риска раннего снижения МПКТ и развития остеопороза. Такое тестирование, безусловно, показано близким родственникам и особенно детям в тех семьях, где уже есть больной остеопорозом. На следующем этапе женщины группы высокого наследственного риска должны быть направлены к врачам для проведения денситометрического анализа и других лабораторных исследований состояния МПКТ. Дальнейший объем мониторинга и профилактики заболеваний определяется результатами лабораторных исследований и данными остеоденситометрии (рис. 6.2.7).

Практическое внедрение предлагаемого алгоритма профилактики остеопороза возможно только в тех регионах страны и городах, где уже проведен детальный популяционный анализ соответствующих генов-кандидатов и подробно изучены особенности распределения аллельных частот этих генов у больных остеопорозом и у заведомо здоровых лиц с нормальными показателями состояния костной ткани.

В частности, насколько нам известно, особенности аллельного полиморфизма вышеприведенных генов-кандидатов уже изучены на больших выборках здоровых индивидов (более 250 человек) и больных остеопорозом (более 350).

Результаты разных авторов из разных лабораторий Санкт-Петербурга в целом совпадают и позволяют достаточно объективно судить не только о популяционных частотах различных аллелей этих генов, но и об особенностях их распределения у женщин с нарушениями МПКТ [9, 65, 138, 139]. Прогностически неблагоприятными в плане остеопороза для жителей Санкт-Петербурга и Северо-Западного региона РФ являются *s*-аллель гена *COL1A1*, *t*-аллель гена *VDR*, а также *xx*-генотип по гену *ERα*. Тестирование соответствующих вариантов полиморфизма этих трех генов может быть рекомендовано на первом этапе реализации предлагаемого алгоритма [65].

Проведенные генотипические сравнения, а также анализ аллельных частот однозначно показывают наличие четкой ассоциации остеопороза с присутствием функционально неполноценных аллелей генов *COL1A1* и *VDR*. Такая ассоциация проявляется особенно отчетливо при наличии в генотипе сразу двух неполноценных аллелей, то есть в случае гомозиготности по аллелям *s* и *t*. Имеющиеся результаты доказывают также наличие четкой ассоциации мутантных аллелей генов *VDR* и *COL1A1* с повышенной скоростью потери МПКТ. В практическом плане это обстоятельство особенно существенно, поскольку из него следует, что тестирование аллельных вариантов генов *COL1A1* и *VDR* задолго до наступления менопаузы у женщин и у мужчин преклонного возраста позволяет с большой вероятностью выявить лиц с выраженной наследственной предрасположенностью к остеопорозу. Именно у таких индивидов, согласно нашим данным, вероятность остеопороза в 10–15 раз выше, чем в среднем в популяции. Из этого следует принципиально важный вывод: у 3–10% всего населения Северо-Западного региона России, относящихся к группе высокого риска по результатам генетического тестирования, профилактику остеопороза и его

досимптоматическое лечение следует начинать максимально рано и проводить особенно интенсивно. Именно для этой группы населения применение лечебных доз высокоактивных протекторов остеопении и остеопороза, таких как препараты фирмы «Никомед» (Кальций D₃ Никомед) может быть жизненно необходимо. Предложенный нами алгоритм успешно внедряется в клиническую практику ряда лечебных учреждений Санкт-Петербурга: поликлиника НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта, МСЧ № 22 и др.

Близкий по сути, но не идентичный нашему, алгоритм выявления индивидов с повышенным риском остеопорозных переломов недавно предложен в Великобритании. Группой английских исследователей во главе с президентом Европейской ассоциации по изучению костной ткани (ECTS) профессором Стюартом Ралстоном (Stuart Rullstone) разработана и запатентована диагностическая тест-система, включающая в себя определение *Sp1*-генотипов по гену *COL1A1* и показатели МПКТ, с целью выявления индивидов с повышенным риском остеопоротических переломов. Метод основан на том, что лица с *ss*-генотипом по гену *COL1A1* и с низкими значениями МПКТ имеют в 25 раз больший риск остеопоротических переломов по сравнению с носителями других *Sp1*-генотипов и нормальных показателей МПКТ [441].

Заключение

Остеопороз, как типичное МФЗ, является результатом взаимодействия многих наследственных (генетических) факторов и неблагоприятных факторов внешней среды. При этом основную роль в патогенезе заболевания в настоящее время отводят генетическим факторам, которых уже сегодня насчитывают более 30. Эти гены рассредоточены, по крайней мере, по 5 различным генным сетям как локального, так и интегрального порядка (см. главу 3), которые прямо или косвенно обеспечивают процессы остеогенеза и костного ремоделирования. Экзогенные факторы остеопороза достаточно хорошо изучены. Они включают в себя: эндокринные нарушения (метаболизм эстрогенов — постменопаузальный остеопороз), различные заболевания внутренних органов, приводящие к дисбалансу ионов кальция и снижению МПКТ, неблагоприятные факторы образа жизни, провоцирующие нарушения костного метаболизма. Существенный прогресс в ранней диагностике и профилактике остеопороза за последнее десятилетие достигнут благодаря внедрению в лабораторную практику точных методов количественной денситометрии и

разработки четких количественных критериев оценки МПКТ. Несмотря на большую противоречивость данных по генетике остеопороза, результаты обстоятельных популяционных исследований и данные мета-анализов, обобщающих результаты работ многих лабораторий, позволили установить наличие по крайней мере 5 генов, аллельные варианты которых достоверно ассоциированы с низкой МПКТ, ведущей к остеопении, остеопорозу и патологическим переломам костей. Такими генами-кандидатами на сегодня являются гены *COL1A1*, *VDR*, *CTR*, *ERα* и *BGP*. При этом главными из них, по-видимому, являются гены *COL1A1*, *VDR* и *CTR*, а для населения Санкт-Петербурга и Северо-Западного региона РФ — гены *COL1A1*, *VDR* [9, 65, 138, 139].

Тестирование аллельных вариантов этих генов открывает широкие возможности для профилактики остеопороза, так как позволяет эффективно выявлять лиц с высоким риском заболевания задолго до появления остеопении, то есть еще до начала снижения МПКТ. Согласно предлагаемому алгоритму, выявление гетерозигот и, тем более, гомозигот по патологическим аллелям генов коллагена $\alpha 1$ (*COL1A1*) и рецептора витамина D_3 (*VDR*), у которых вероятность остеопороза в 10–15 раз выше, чем в среднем в популяции, позволяет своевременно начать лечебные мероприятия по предотвращению остеопении и нарушений остеогенеза.

По нашему глубокому убеждению, **массовое генетическое тестирование женщин репродуктивного возраста, последующая диспансеризация носительниц функционально неполноценных аллелей (генотипов) в сочетании с обязательным денситометрическим анализом, дополненным своевременными упреждающими терапевтическими мероприятиями (диета, лекарственная терапия), позволят создать эффективную систему профилактики остеопороза, предотвратят от тяжелых травм и спасут жизни многих тысяч людей.**

6.3. ДИАБЕТ

Введение

Сахарный диабет (СД) представляет собой одну из важных медико-социальных проблем современной медицины всех стран, включая Россию. СД входит в пятерку наиболее распространенных болезней современного мира [91]. Его частота, по среднемировым статистическим данным, неуклонно возрастает. По данным ВОЗ, в настоящее время в мире по минимальным оценкам около 170 млн человек страдают сахарным диабетом,

а к 2030 году ожидается увеличение их числа до 366 млн человек. В России сейчас насчитывается 4 576 000 больных диабетом (официальный сайт ВОЗ). Актуальность проблемы определяется не только широкой распространенностью СД, но и большой частотой сопутствующих осложнений, ранней инвалидизацией и высокой смертностью [113].

Все это указывает на большую социальную и клиническую значимость поиска новых путей раннего выявления лиц повышенного риска СД, его эффективной профилактики и лечения.

В настоящее время известно более 70 моногенных синдромов, при которых отмечается клинически выраженная толерантность к глюкозе и диагностируется та или иная форма СД. При этом на долю всех редких моногенных форм СД приходится не более 1 % таких случаев, тогда как подавляющее большинство СД представлено типичными мультифакториальными (мультифакторными) заболеваниями, доля наследственного компонента в котором превышает 50 % [122, 132]. О полигенной природе СД свидетельствует сравнительно низкий уровень семейного риска болезни. Его многофакторную природу доказывает наличие многих достаточно хорошо известных неблагоприятных внешних провоцирующих агентов, которые на фоне неблагоприятного генотипа приводят к развитию заболевания. Гены предрасположенности к СД широко распространены в популяциях, но при этом каждый из них сам по себе, как правило, недостаточен для развития СД. Только наличие определенных комбинаций неблагоприятных аллельных вариантов таких генов на фоне провоцирующих внешних факторов среды может приводить к заболеванию СД того или иного типа.

С помощью клинических и лабораторных тестов достаточно четко различают два основных типа СД: инсулинзависимый СД, или СД типа 1 (СД1), и инсулиннезависимый СД, или СД типа 2 (СД2). СД1 рассматривается по своему генезу как типичное аутоиммунное заболевание, для которого характерным является наличие специфических аутоантител к бета-клеткам островков Лангерганса, вырабатывающих инсулин [149]. СД типа 2 (СД2) обычно трактуют как результат клинического проявления сложного метаболического синдрома. Наличие специфических аутоантител у 90 % больных СД1 и их отсутствие у 95 % больных СД2 является важнейшим критерием для дифференциальной диагностики этих заболеваний.

Существуют и другие, более редкие моногенные варианты СД: 1) СД MODY1 (хромосома 20, ген *HNF4a*); 2) MODY2 (хромосома 7, ген

глюкокиназы); 3) MODY3 (хромосома 7, ген *HNF1a*); 4) MODY4 (хромосома 13, ген *IPF-1*); 5) митохондриальная мутация ДНК 3243 и др. К этой группе относятся также типы СД, в патогенезе которых четко установлена причина заболевания, обусловленная нарушением определенных генов. Развитие диабета в таких случаях сочетается с моногенным дефектом функции β -клеток. Развитие СД MODY1 и 2 связано с мутацией гена печеночных транскрипционных факторов 4a или 1a, которые экспрессируются в печени и β -клетках островков поджелудочной железы. СД MODY3 обусловлен мутацией гена глюкокиназы. Причиной развития диабета MODY4 является мутация гена инсулинового промоторного фактора (*IPF-1*). Важным открытием последних лет явилось также обнаружение СД, обусловленного мутацией митохондриального гена, в частности мутацией *tRNA^{Leu} (UUR)*. Впервые эта точечная мутация была описана при MELAS-синдроме (митохондриальная миопатия, лактатацидоз, энцефалопатия и инсультоподобные эпизоды). Одним из компонентов MELAS-синдрома является наличие диабета с потерей или без потери слуха [28]. К другим формам СД относятся семейные случаи, протекающие с клинической картиной СД2, обусловленные мутантными или аномальными формами инсулина («чикагский инсулин», «лосанджелесский инсулин», «инсулин Вакаяма»), которые сохраняют лишь 5–10% биологической активности нативного инсулина [28]. Развитие диабета может быть обусловлено генетическими нарушениями, связанными с периферическим действием инсулина, то есть быть следствием мутаций гена рецепторов инсулина.

6.3.1. Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД, СД1)

СД1 (инсулинзависимый — ИЗСД) — широко распространенное, тяжело протекающее заболевание, нередко приводящее к ранней инвалидизации и смерти. Болезнь обычно развивается уже в детстве и часто сопровождается такими тяжелыми осложнениями, как поражения кровеносных сосудов, полинейропатии, почечная недостаточность, слепота, гангрены и др. Скорость развития заболевания и типы осложнений в значительной степени зависят от генетической предрасположенности.

В настоящее время около 20 млн человек в мире страдают ИЗСД. В России его популяционная частота составляет 1–3 на 1000, а общее число больных оценивается в 250 тысяч человек [91, 113]. В патогенезе ИЗСД широко представлены как эндогенные, так и многочисленные экзогенные факторы (рис. 6.3.1). Результирующим эффектом эндоген-

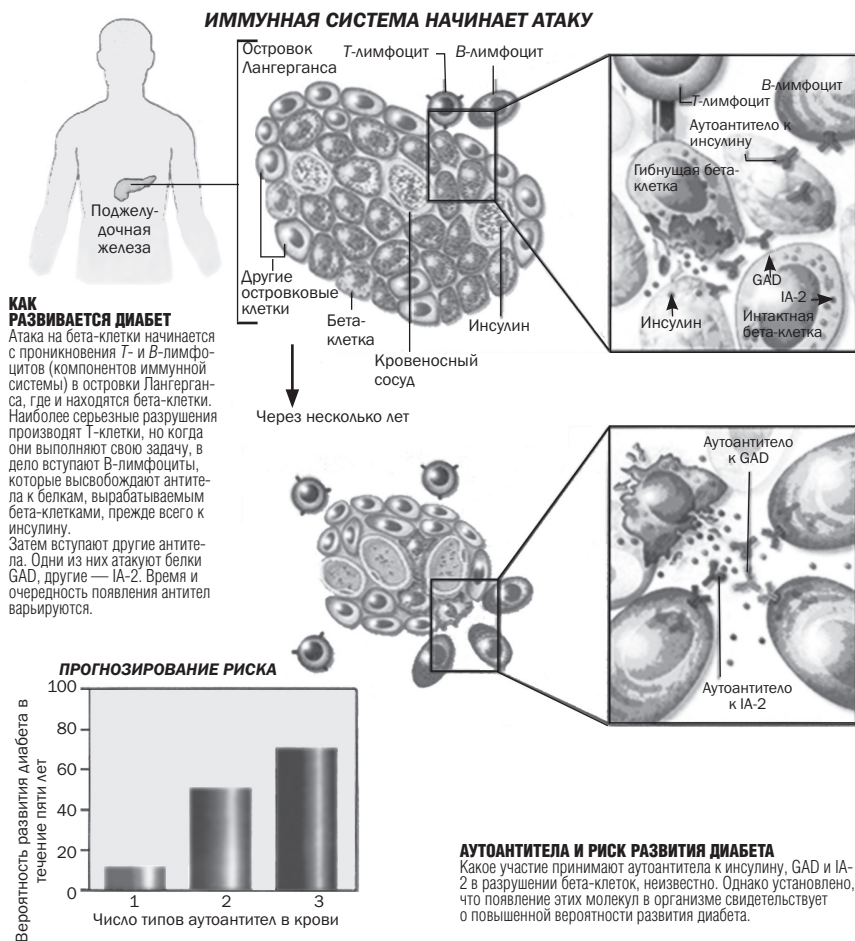


Рис. 6.3.1. Принципиальная схема патогенеза сахарного диабета типа 1

ных (генетических, иммунологических, гормональных) и экзогенных (инфекции, пищевые токсины) факторов являются нарушения функции или гибель β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, секретирующих инсулин.

Выделяют пять основных стадий развития заболевания.

На начальной стадии β -клетки поджелудочной железы функционируют нормально, но имеются аллельные варианты ряда генов, предрасполагающие к аутоиммунному разрушению β -клеток (первая стадия). Инициация их разрушения знаменует начало второй стадии, а период активной деструкции соответствует третьей стадии. Клинически ИЗСД

начинает проявляться, когда в поджелудочной железе остается не более 15 % β -клеток (четвертая стадия) [90].

Согласно современным представлениям, предрасположенность к СД1 формируется еще в пренатальном периоде и является результатом нарушений механизмов иммунологической толерантности в тимусе. В результате этих нарушений не происходит самоуничтожения (апоптоза) части аутореактивных Т-клеток, которые начинают атаковать некоторые собственные белки, принимая их за чужеродные [147].

6.3.1.1. Генетические детерминанты СД1

Семейные и близнецовые исследования свидетельствуют о важной роли наследственности в развитии ИЗСД. Частота семейных случаев СД1 существенно превышает популяционный уровень [424], а частота заболевания у sibсов больных СД1 в 10 раз выше, чем в общей популяции (6 и 0,4 % соответственно) [513]. Конкордантность по заболеваемости СД1 у близнецов старше 12 лет варьируется от 33 до 73 %, составляя в среднем 53 % [363, 550]. В целом на долю наследственных факторов отводится до 85 % случаев СД1.

Генетическая предрасположенность к СД1 рассматривается как комбинация функционально неблагоприятных аллелей самых разных групп генов. Для многих генов-кандидатов СД1 хорошо установлен полиморфизм, четко идентифицированы неблагоприятные аллели. Генные сети СД1 представлены на рисунке 6.3.2.

В генной сети выделяют следующие основные группы генов:

- 1) гены главного комплекса гистосовместимости *HLA*, ответственные за продукцию, транспорт и представление на клеточных мембранах соответствующих антигенов (*HLA*, класс II и III);
- 2) гены, контролирующие продукцию цитокинов (*IL1*, *IL1R1*, *IL1N1*, *TNFA*);
- 3) ген инсулина — *INS*;
- 4) гены, включающие механизмы деструкции, защиты и репарации β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы (*SOD2*, *HSP-70*, *NOS2*);
- 5) Известные и еще неидентифицированные гены локусов *IDDM*.

Ведущая роль в гибели β -клеток, продуцирующих инсулин, отводится генам *HLA* класса II — *DRB1*, *DQA1* и *DQB* (гаплотипы *DR3* и *DR4*), вклад которых в развитие СД1 в различных популяциях, по обобщенным данным, варьируется от 30 до 40 % [91, 147].

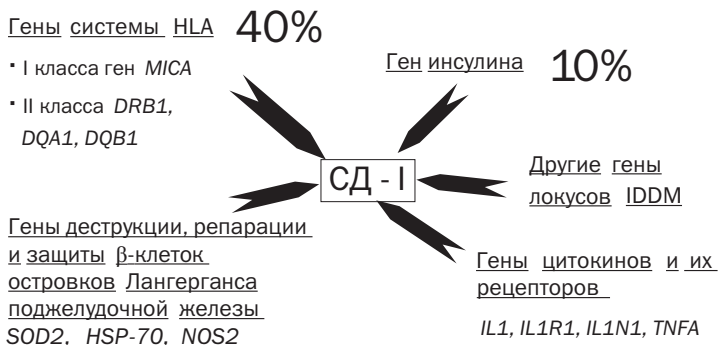
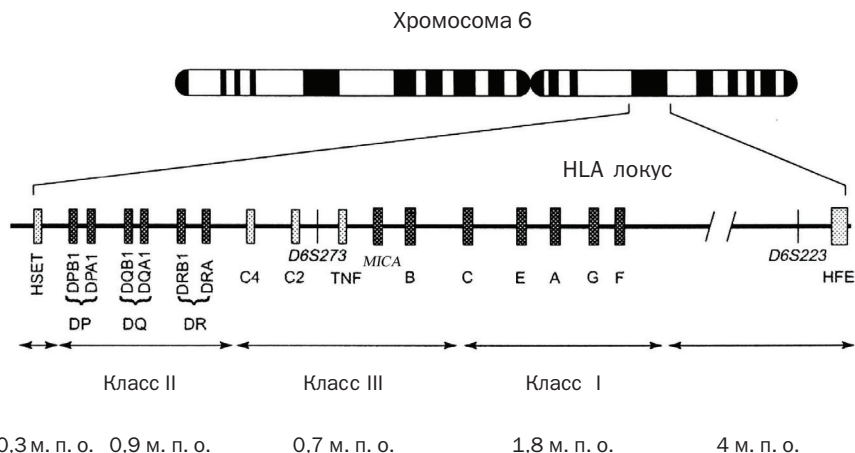


Рис. 6.3.2. Генные сети СД тип 1

Рис. 6.3.3. Хромосомная локализация и структура *HLA*-локуса [783]

HLA-комплекс

Гены *HLA*-комплекса расположены на коротком плече 6-й хромосомы (6p21) (рис. 6.3.3) и включают в себя главные генетические детерминанты СД1. Этот регион занимает область размером до 20 сантиморганид. *HLA*-комплекс состоит из генов, которые кодируют различные белки, вовлеченные в иммунный ответ.

В зависимости от структуры и функций белковых продуктов, *HLA*-гены подразделяют на 3 большие класса. Наиболее близко расположенный к теломере класс I представлен генами *HLA-A*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*. Эти гены кодируют поверхностные клеточные гликопротеины, представленные на наружной цитоплазматической мембране большинства клеток человека.

Лежащие ближе к центромере гены класса II (*HLA-DR*, *DQ* и *DP*) кодируют α - и β -цепи, которые формируют гетеродимеры, экспрессирующиеся на поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты. Гены класса III кодируют компоненты комплемента (C2, C4, Bf), α - и β -факторы некроза опухолей, белки теплового шока, 21-ОН-гидроксилазу. Для всего *HLA*-региона характерен выраженный генетический полиморфизм [53, 663].

Ассоциация аллелей *HLA*-генов с СД1

Имеются данные, что продукты генов *HLA* II класса запускают аутоиммунный процесс при СД1 [783]. Связь между генами *HLA*-локуса и СД1 подтверждается результатами анализа частот определенных аллельных вариантов этих генов у больных СД1 в различных популяциях [242, 663].

Гены *HLA-DQA1*, *DQB1* и *DRB1* характеризуются выраженным полиморфизмом. Вследствие вариабельности нуклеотидной последовательности преимущественно во 2-м экзоне этих генов появляется множество аллельных вариантов. К настоящему моменту известно не менее 19 аллелей гена *DQA1*, 35 аллелей гена *DQB1* и более 32 аллелей гена *DRB1* [663]. Исследования на разных популяциях показали, что определенные аллельные варианты *HLA* — *DQ8* (*DQA1 0301–DQB1 0302*), *DQ2* (*DQA1 0501–DQB1 0201*) достоверно чаще представлены у больных с СД1 (табл. 6.3.1) по сравнению с контролем [577].

Около 30% пациентов с СД1 являются гетерозиготами *DQ2/DQ8* [147]. Аллели гена *DQ6* (*HLA-DQA1 0102; DQB1 0602*), напротив, достоверно реже встречаются у больных СД1 в сравнении с таковыми в популяции (табл. 6.3.1). Это позволяет предполагать наличие протективного эффекта *DQ6* в отношении СД1.

В серии работ, выполненных под руководством проф. В. В. Носикова, по изучению частот аллелей генов *DQA1* и *DQB1* у больных СД1 и у здоровых индивидов русского происхождения установлено неслучайное распределение аллелей и выявлены аллельные ассоциации, близкие по частотам к таковым в других европейских популяциях. Так, у больных СД1 достоверно чаще по сравнению с контролем встречаются аллели *DQA1* — 0301; 0401 и *DQB1* — 0201; 0302 и достоверно реже аллели *DQA1–0101; 0201* и *DQB1* — 0503, 0602, 0603, 0301 [73, 147].

Наиболее «диабетогенные» аллели *DQA1* кодируют остаток аргинина в положении 52 α -цепи (Arg52+). Для «диабетогенных» аллелей *DQB1*

Таблица 6.3.1

Аллели и гаплотипы генов *HLA*-класса II, ассоциированные с СД 1 [663]

<i>HLA-DQ</i> -аллели	<i>HLA-DR</i> -аллели	Относительный риск
Позитивная ассоциация (предрасполагающие гаплотипы)		
<i>A1*0301-B1*0302</i>	<i>DRB1*04</i>	2,5–9,5
<i>A1*0501-B1*0201</i>	<i>DRB1*301</i>	2,5–5,0
<i>A1*0501-B1*0302</i>	<i>DRB1*301/DRB1*04</i>	12,0–32,0
<i>A1*0301-B1*0201</i>	<i>DRB1*301/DRB1*04</i>	–
<i>A1*0301-B1*0402</i>	<i>DRB1*04/DRB1*801</i>	4,0–15,0
<i>A1*0301-B1*0201</i>	<i>DRB1*701</i>	8,0–13,0
<i>A1*0301-B1*0201</i>	<i>DRB1*901</i>	5,5
<i>A1*0301-B1*0401</i>	<i>DRB1*04</i>	3,5–4,5
<i>A1*0301-B1*0303</i>	<i>DRB1*901</i>	2,0–4,5
Негативная ассоциация (протективные гаплотипы)		
<i>A1*0102-B1*0602</i>	<i>DRB1*1501</i>	0,03–0,2
<i>A1*0103-B1*0603</i>	<i>DRB1*1301</i>	0,05–0,25
<i>A1*0301-B1*0301</i>	<i>DRB1*04</i>	0,2–0,5
<i>A1*0501-B1*0301</i>	<i>DRB1*1101</i>	0,05–0,5

характерна замена нуклеотидов, приводящая к отсутствию аспарагина в положении 57 β -цепи (Asp57–). Эти аллели были условно обозначены как **предрасполагающие (S)** к СД1, а их антиподы (Arg52– и Asp57+) — как **«предохраняющие» (P)**. Предрасполагающие аллели *DQA1* обнаружены у 83%, а аллели *DQB1* — у 87% больных СД1, у которых они встречаются почти вдвое чаще, чем у здоровых (45 и 47% соответственно). **Наиболее высокие показатели риска развития СД1 имеют носители аллелей *DQA1*0301* и *DQB1*0302***. Показатели наследственного риска СД1 особенно значительны при учете не отдельных аллелей, а их комбинаций, включающих все четыре аллеля этих двух генов *HLA*-локуса. Так, гомозиготы по всем 4 предрасполагающим аллелям генов *DQA1* и *DQB1* у больных СД1 составили 52%, а в контроле — только 4% [147]. Рассчитанный абсолютный риск развития СД1 у русских с таким генотипом по данным лаборатории профессора В. В. Носикова, составил 2,54, что в 13 раз выше, чем в среднем для общей популяции Москвы [147]. При наличии только трех *S*-аллелей абсолютный риск снижался сразу до 0,4, в то время как для русской популяции в целом он ниже 0,05 [147]. Существенные межпопуляционные и этнические различия частоты СД1, как было установлено, достаточно четко коррелируют с частотами пред-

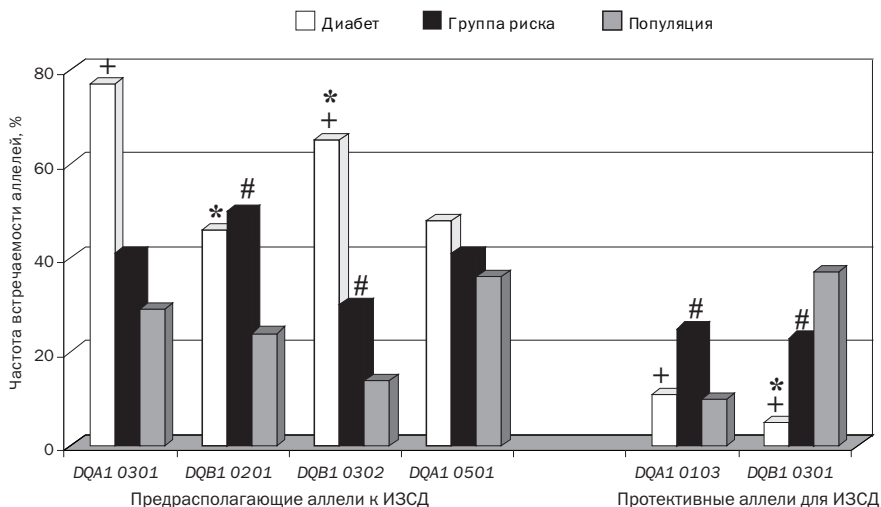


Рис. 6.3.4. Частоты аллелей генов *DQA1* и *DQB1* у больных СД1, у их близких родственников (РСД1) и в контрольной группе

Примечание: * — при $p < 0,05$ достоверные отличия между больными диабетом и контрольной группой; + — при $p < 0,05$ достоверные отличия между больными диабетом и группой риска; # — при $p < 0,05$ достоверные отличия между группой риска и контрольной группой

располагающих аллелей *DQA1* и *DQB1*, что лишний раз свидетельствует о ведущей роли наследственности в генезе СД1.

Выявленные аллели генов *DQA1* и *DQB1*, безусловно, играют наиболее важную роль в развитии СД1, в связи с чем *HLA*-локус получил обозначение *IDDM1* (Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Данный локус определяет почти 35% семейного наследования СД1 и обладает самым высоким среди других *IDDM*-локусов величиной MLS — 33–34 (отношение риска развития заболевания у потомков больных СД1 к общепопуляционному риску) [147].

В наших исследованиях родственников 1-й степени больных СД1 (РСД1) Северо-Западного региона России показано достоверное увеличение частоты аллеля *DQB1 0302* в ряду «контрольная выборка — РСД1 — больные СД1» (см. рис. 6.3.4). Данный факт хорошо согласуется с ранее полученными сведениями о наличии ассоциации *DQB1 0302* с СД1 в европейских популяциях [663] и Центральном регионе России [147].

Для жителей Северо-Западного региона России установлена также положительная ассоциация СД1 с аллелями *DQA1 0301* и *DQB1 0201* и от-

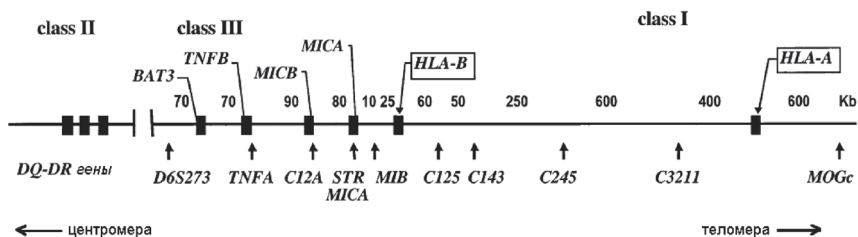


Рис. 6.3.5. Положение гена *MICA* в составе *HLA*-комплекса

рицательная — с аллелем *DQA1 0501*. Протективный эффект в отношении СД1 отмечен также для аллелей *DQA1 0103* и *DQB 0301* (рис. 6.3.4).

В отличие от большинства других изученных популяций, ассоциация с СД1 аллелей другого гена *HLA*-класса II — *DR4* — у жителей Северо-Западного региона России, согласно нашим данным, выражена довольно слабо [491].

Таким образом, для определения наследственного риска развития ИЗСД у родственников 1 степени больных СД1 представляется целесообразным тестировать аллели *DQA1 0301*, *DQB1 0201*, *DQB1 0302*, *DQA1 0103* и *DQB1 0301*.

Важным для патогенеза СД1 является ген *MICA* на коротком плече 6 хромосомы между генами *TNFA* и *DB* (рис. 6.3.5). Предполагается, что *MICA*-ген регулирует активность натуральных киллеров и Т-лимфоцитов [243].

Полиморфизм гена *MICA* представляет собой тандемные GCT повторы в экзоне 5. Убедительно продемонстрировано, что *MICA*-5 аллель ассоциирован с ранней манифестацией СД1, а *MICA*-5.1-аллель — с поздней [294, 778]. Сочетание гаплотипов *DR3*, *DR4* с аллелем гена *MICA*-5 увеличивает риск заболевания в 172 раза [294].

Результаты анализа ассоциации различных генотипов по гену *MICA* с СД1 у жителей Северо-Западного региона России приведены на рисунке 6.3.6. Установлено, что частота генотипа *MICA* — 4./9 в группе высокого риска по СД1 (РСД1) составляет 11 %, тогда как в контрольной выборке данный генотип не зарегистрирован ($\chi^2 = 7,34$, $p < 0,01$). Частота генотипа *MICA* — 5.1/6 также достоверно выше ($\chi^2 = 5,67$, $p < 0,05$) в группе РСД1 по сравнению с контролем.

Помимо *HLA*-локуса (IDDM1) методом полного геномного скрининга идентифицировано еще свыше 20 хромосомных локусов, определяющих наследственную предрасположенность к СД1 (табл. 6.3.2).

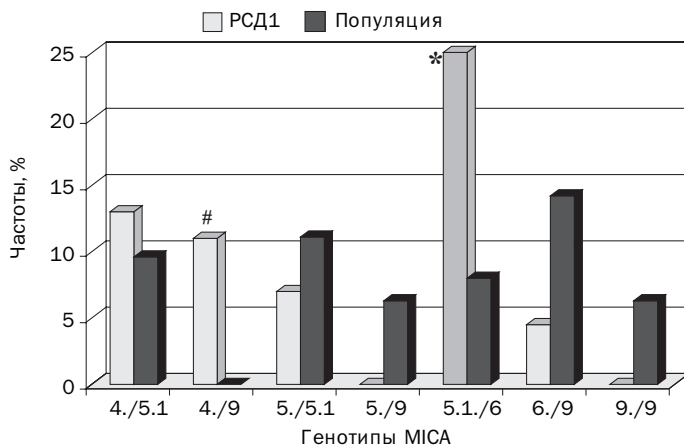


Рис. 6.3.6. Частоты генотипов *MICA* в группе риска (РСД1) и в контрольной группе.

Примечание: * — достоверные отличия при $p < 0,05$;

— достоверные отличия при $p < 0,01$

Первый по значимости «не-*HLA*» локус предрасположенности к СД1 находится в хромосоме 11 (11p15.5) и соответствует **гену инсулина (*INS*)**.

Ген инсулина (*INS*)

Ассоциированный с СД1 полиморфизм находится в промоторной области гена *INS* и представляет собой тандемный повтор типа VNTR (см. главу 2), состоящий из варьирующих по числу фрагментов размерами 14–15 п. н. (рис. 6.3.7):

TH — ген тирозиназы;

VNTR — варибельная часть промоторной области гена инсулина;

INS — ген инсулина;

IGF2 — ген инсулинового фактора роста (рецептора инсулина).

Число повторов варьируется от 26 до 200. В зависимости от их числа, аллели гена *INS* подразделяют на 3 класса. Класс I содержит от 26 до 63 повторяющихся единиц, класс III — от 141 до 200. Промежуточный класс II состоит из аллелей, содержащих около 80 тандемных повторов, которые сравнительно редко встречаются у представителей белой расы [331].

Исследование европейских популяций указывает на достоверное увеличение частоты аллелей гена *INS* класса I у больных ИЗСД по сравнению со здоровыми [331]. Присутствие двух аллелей гена *INS* класса I является безусловным фактором наследственной предрасположенности к СД1.

Таблица 6.3.2

Локусы, определяющие генетическую предрасположенность к СД1 [91, 147]

Локус	Ген-кандидат	Хромосомная локализация	Λ s	Семейный риск СД-1, %%
IDDM1	<i>HLA</i>	6q21.3	2,60	32–42
IDDM2	<i>INS</i>	11p15.5	1,29	10–12
IDDM3	–	15q26	–	–
IDDM4	<i>LRP5</i>	11q13	1,07	2
IDDM5	–	6q25	1,15	5
IDDM6	<i>DCC</i>	18.q21	1,10	4
IDDM7	–	2q31	1,13	5
IDDM8	–	6q27	1,17	13
IDDM9	–	3q21–q25	1,26	8
IDDM10	–	10p11.2	1,56	14
IDDM11	–	14q24–q31	–	–
IDDM12	<i>CTLA4</i>	2q32.1–q33	1,61	–
IDDM13	–	2q33–q34	1,60	–
IDDM15	<i>TNDM</i>	6q21	1,34	–
IDDM16	–	14q32.3	–	–
IDDM17	<i>FAS</i>	1q22.3	–	–
IDDM18	<i>IL12B</i>	5q31–q33	–	–
GCK	<i>GCK</i>	7p	–	–
NOS2	<i>NOS2</i>	17q11.2	–	–
CD4	<i>CD4</i>	–	–	–
IL18	<i>IL18</i>	11q22.2–q22.3	–	–

Таким образом, полиморфизм, обусловленный небольшим числом tandemных повторов гена *INS* (класс I), увеличивает риск наследственной предрасположенности к СД1. Напротив, аллели *INS* класс III (большое число VNTR-повторов) оказывают доминантный протективный эффект. В целом неблагоприятные аллели гена *INS* ответственны за 5–15 % семейных случаев СД1. **При совместном тестировании локусов IDDM1 и IDDM2 возможно досимптоматическое выявление 40–60 % лиц группы риска с наследственной предрасположенностью к СД1.**

Высокая частота семейного риска СД1 (более 10 %) показана для *IDDM8* (6q27) и *IDDM10* (10p11.2), где локализуются еще неидентифицированные гены предрасположенности к СД1.

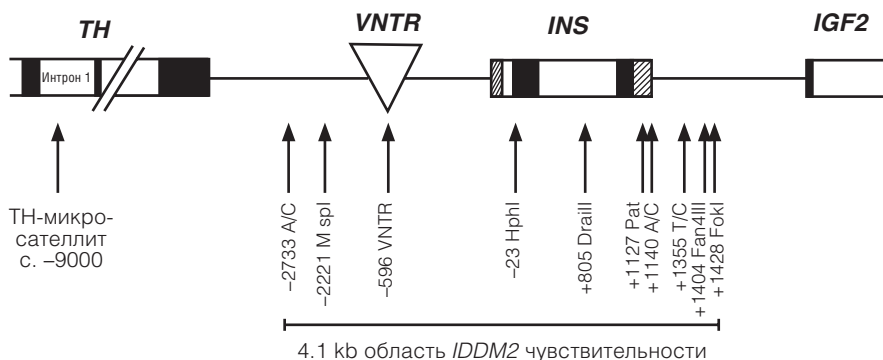


Рис. 6.3.7. Фрагмент хромосомы 11, содержащий ген инсулина

Для шести других хромосомных локусов, для которых доказано неслучайное сцепление с СД1, конкретные гены-кандидаты уже идентифицированы. В частности, для локусов **IDDM4** — ген *LRP5*, **IDDM6** — ген *DCC*, **IDDM12** — ген *CTLA4*, **IDDM15** — ген *TNDM*, **IDDM17** — ген *FAS* и **IDDM18** — ген *IL12B*. Ген (*CTLA4*), кодирующий один из поверхностных антигенов цитотоксических Т-лимфоцитов, а также ген *PDCD2*, кодирующий активатор программируемой гибели клеток, наряду с генами локуса *HLA* (*IDDM1*) участвуют в процессе программируемой гибели аутореактивных Т-клеток в тимусе [147]. В результате геномного сканирования, проведенного на коллекциях семей европейского происхождения с высоким риском СД-1, в группу генов предрасположенности к СД1 были отнесены *GSK*, *NOS2*, *CD4*, *IL18*, сцепление полиморфных маркеров которых с СД1 еще требует уточнения (табл. 6.3.2).

Ген *CTLA4*

Ген *CTLA4* (**IDDM12**) локализован в области 2q33, кодирует один из поверхностных антигенов цитотоксических Т-лимфоцитов, играет роль в некоторых аутоиммунных заболеваниях [300]. Установлена ассоциация двух полиморфных маркеров гена *CTLA4* с диабетом в популяции Северо-Западного региона России. Один из маркеров представляет собой микросателлит (AT)_n в 3'-нетранслируемой области гена, другой расположен внутри его кодирующей части и представляет собой однонуклеотидную замену в положении 49 экзона 1 (A49G) [73]. Ассоциация этого полиморфизма с СД1 установлена для европейских популяций и недавно показана для японцев [300].

Показано достоверное увеличение частоты аллеля *G* ($p = 0,0499$) у больных СД1 с высоким уровнем антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты, которые рассматриваются как удобные иммунологические маркеры для диагностики аутоиммунного диабета с манифестацией после 35 лет [671].

Масштабные исследования проводятся и по поиску ассоциаций определенных генов с частыми осложнениями СД1 [73, 147]. К таким осложнениям, прежде всего, относятся нефропатия, ретинопатия, полинейропатия, которые нередко в клинической практике объединяются под общим термином **диабетические ангиопатии**. Решающая роль в патогенезе этого заболевания принадлежит внутрисосудистому и, главное, внутриклеточному повышению уровня глюкозы, следствием чего является резкое увеличение концентрации свободных радикалов и перекисей (оксидативный стресс), а также нарушениям системы регуляции сосудистого тонуса и липидного обмена.

В частности, показана ассоциация диабетической нейропатии (ДНП) с полиморфными маркерами Ala(-9)Val гена супероксиддисмутазы-2 (*SOD2*), Arg213Gly (*SOD3*), T(-262)C гена каталазы (*CAT*), а также с 4G/5G полиморфизмом промоторной области гена NO-синтазы (*NOS2*). Эти результаты позволяют предполагать важную роль **окислительного стресса** в возникновении ДНП у больных СД1 [147]. Достоверная ассоциация с диабетической полинейропатией установлена у русских пациентов города Москвы с СД1 и для полиморфного маркера Pro72Arg гена *TP53*. Наличие аминокислоты пролина в 72-й позиции белка онкосупрессора p53 вдвое увеличивает риск данного осложнения. В то же время присутствие аминокислоты аргинина оказывает протективное действие в отношении **диабетической полинейропатии** [164].

Другое грозное осложнение СД1 — **диабетическая нефропатия** — не связано с окислительным стрессом, но является частым осложнением гипергликемии, приводящей к специфическим изменениям почечной ткани. Важными нефротоксическими факторами являются также гиперлипидемия, нефросклероз и сопутствующая им гипертензия. В генезе последней важная роль отводится продуктам генов ренин-ангиотензиновой системы, участвующих в регуляции кровяного давления и электролитного баланса в организме. Не случайно гены ренин-ангиотензиновой системы также рассматриваются как гены-кандидаты диабетической нефропатии [22]. Развитие осложнения ассоциировано с полиморфными

вариантами генов, контролирующих тонус сосудов (*I/D* — ген *ACE*; *4a/4b* гена *NOS3*), а также играющих важную роль в метаболизме и транспорте липидов (*I/D* — *APOB*; *e2/e3/e4 APOE*) [164]. Предполагается, что развитие диабетической ангиопатии у больных с СД1 инициируется наличием одного главного гена, тогда как скорость процесса определяется неблагоприятными аллельными сочетаниями других генов. Исходя из результатов геномного поиска [300], «главным» геном диабетической ангиопатии является *IDDM9* и он локализован в области 3q21–25 [147].

Как показывает проведенный анализ, в настоящее время возможно не только с достаточно большой уверенностью проводить генетическое тестирование семей высокого риска по СД1 с целью раннего выявления лиц с наследственной предрасположенностью к заболеванию, но и судить о наиболее вероятных типах индивидуальных осложнений в случае развития болезни. Доклиническая диагностика детей с высоким риском СД1 может иметь важное значение для индивидуального мониторинга заболевания с помощью соответствующих лабораторных тестов на наличие специфических аутоантител и для своевременного начала комплекса профилактических мер по его предупреждению.

В 2007 году в масштабных исследованиях, финансируемых консорциумом Великобритании Wellcome Trust [766], были выявлены новые гены-кандидаты СД1. Гены были обнаружены методом общегеномного сканирования однонуклеотидных замен (техника *MapMap*, см. главу 2) с помощью микрочиповой технологии высокого разрешения (*Affymetrix GeneChip*) на образцах ДНК от 2 000 больных с СД1 и 3 000 от здоровых доноров — все потомственные жители Великобритании. В частности, высокий уровень ассоциации с СД1 был выявлен для C1858T полиморфизма гена *PTPN22* (протеин-тирозин фосфатазы, не-рецептора 22), полиморфизма rs17388568 минорного *A*-аллеля гена *IL2*, полиморфизма ss52580101 rs11594656 гена *IL2RA* рецептора интерлейкина-2α и полиморфизма rs1990760 гена интерферон-индуцируемой геликазы I (*IFIH1/MDA5*). Высокий уровень ассоциации с СД1 обнаружен для генов хромосомы 12 в области 12q13–12q24, где предположительно локализовано свыше 10 генов-кандидатов, в том числе ряд генов, ответственных за иммунные сигналы клеток: *ERBB3* (рецептор тирозин-протеинкиназы), *SH2B3/LNK* (адапторный белок 3 SH2B), *TRAFD1* (TRAF — домен типа цинковых пальцев), а также ген *PTPN11* (протеин-тирозин фосфатаза, нерецепторный белок тип 1). Последний, учитывая его роль в передаче иммунного сигнала, представляет особенно большой интерес. Предпо-

лагается, что именно этот ген обнаруживает наиболее тесную ассоциацию области 12q24 с СД1. Другой ранее неизвестный локус, сцепленный с СД1, расположен в хромосоме 16 (область 16q13), где локализованы два гена неизвестных функций *KIAA0350* и ген дексаметазон-индуцированного рецептора. Сцепление с локусом 18p11, как предполагается, объясняется локализацией в нем гена *PTPN2* (rs2542151), белковый продукт которого, подобно таковым генов *PTPN11* и *PTPN22*, вовлечен в регуляцию иммунного ответа. В хромосоме 10 достоверный уровень ассоциации обнаружен для гена *CD25*, продукт которого представляет собой высокоаффинный рецептор для интерлейкина 2, ген которого в районе 4q27 также сцеплен с СД1 [148]. Естественно, что реальное участие всех обнаруженных генов и их полиморфизма в генезе СД1 требует дальнейших уточнений. Вместе с тем проведенный впервые общегеномный скрининг ассоциаций еще раз доказывает участие многих генов (более 20) в патогенезе СД1. Основная роль при этом отводится генам, контролирующим антигенные свойства клеток и модулирующим силу иммунного ответа. Не исключено, что в зависимости от наличия тех или иных неблагоприятных аллельных вариантов цепь патогенетических событий, которые приводят к гибели инсулин-продуцирующих клеток островков Лангерганса, у каждого больного имеет свои особенности. Важная роль в инициации и реализации патологических реакций, контролируемых генами предрасположенности к СД1, несомненно, принадлежит повреждающим внешним факторам.

6.3.2. Экзогенные факторы риска СД1

Два важных обстоятельства указывают на существенную роль провоцирующих внешних (экзогенных) факторов в генезе СД1. Выраженная, достигающая до 65%, дискордантность СД1 у генетически идентичных близнецов в течение 15 лет после начала заболевания у одного из сибсов. Быстрое увеличение частоты СД1 во 2-й половине XX века, отнюдь не коррелирующее с числом особей, имеющих наследственную предрасположенность. Наконец, следует отметить, что далеко не все индивиды, имеющие полный набор известных неблагоприятных аллелей генов предрасположенности к СД1, действительно заболевают, и, наоборот, отсутствие этих неблагоприятных аллелей не гарантирует устойчивости к СД1.

Результаты многолетних наблюдений и генетических исследований в Финляндии указывают на то, что доля лиц с высоким риском СД1 по генам *HLA*-локуса снизилась на 20%, при этом соответственно существенно

возросла доля лиц с «протективным» *HLA*-генотипом. Наряду с этим, вопреки ожиданиям, за последние 30 лет в стране резко увеличилась частота СД1. Естественно предположение, что такой подъем заболеваемости СД1 определяется действием каких-то неблагоприятных внешних факторов.

Среди наиболее вероятных факторов, принимающих участие в запуске процессов разрушения островковых клеток, в настоящее время выделяют: 1) вирусные инфекции, вызывающие латентно протекающую иммунную реакцию (коксаки, краснуха) или лизис β -клетки (паротит); 2) химические агенты и токсины, разрушающие β -клетки (нитрозамины, содержащиеся в некоторых пищевых продуктах, стрептозотоцин и др.); 3) фактор питания (раннее употребление коровьего молока); 4) некоторые другие факторы, например стресс [205]. Отмечено также, что любые врожденные или перинатальные болезни, провоцирующие развитие аутоиммунных состояний, уже у новорожденных могут дать начало антителам к β -клеткам островков поджелудочной железы.

Таким образом, самой по себе наследственной отягощенности или только внешних факторов недостаточно для развития СД1. Болезнь, как правило, развивается у генетически предрасположенных индивидов на фоне действия неблагоприятных внешних факторов. Взаимодействие неблагоприятных и еще до конца не идентифицированных генетических детерминант с провоцирующими и также пока недостаточно изученными факторами внешней среды создает условия для высокой вероятности развития СД1. Вместе с тем складывается впечатление, что уже на современном уровне наших знаний СД1 можно предотвратить или его манифестация может быть существенно отсрочена путем внесения соответствующих изменений в образ жизни индивида, его питание. Тестируя соответствующие полиморфные маркеры уже известных генов-кандидатов, можно выявить до 60% лиц с наследственной предрасположенностью к СД1.

Алгоритм обследования родственников 1-й степени родства с целью раннего, досимптоматического выявления лиц с высоким риском СД1 приведен на рисунке 6.3.8.

- На первом этапе необходимо проводить семейный анализ аллелей *DQA1 0301*, *DQA1 0501*, *DQB1 0201*, *DQB1 0302*, ассоциированных с ИЗСД.
- Если при проведении семейного анализа обнаружено носительство одного и того же аллеля у обследуемых родственников и у больного СД1, будет предложено проведение исследований крови на наличие антител к β -клеткам поджелудочной железы.

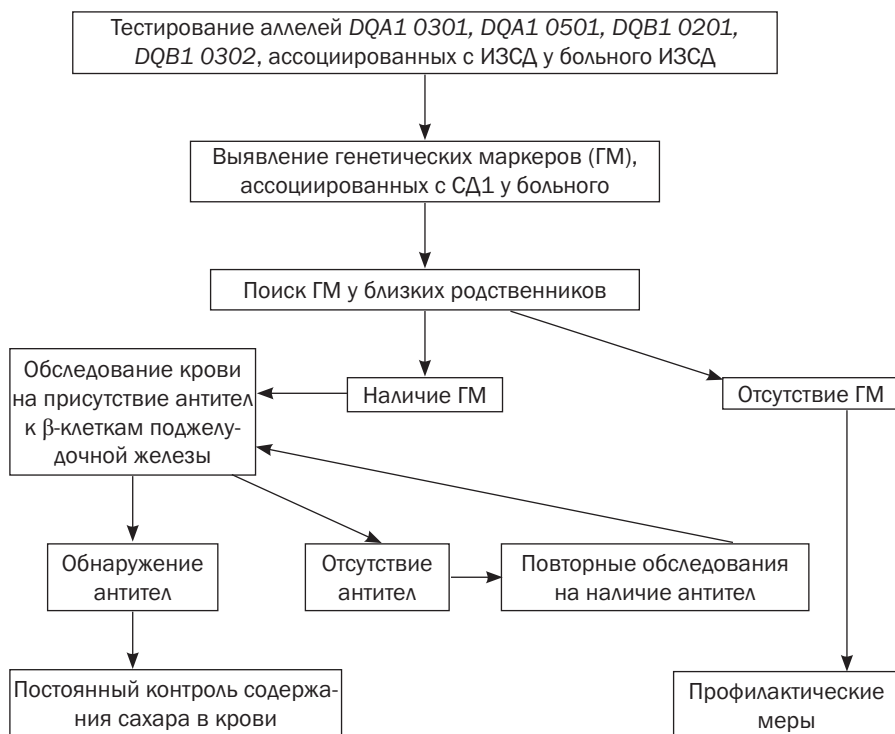


Рис. 6.3.8. Алгоритм обследования родственников 1-й степени родства больных сахарным диабетом 1-го типа

- В случае выявления антител к β -клеткам поджелудочной железы обследуемым родственникам может быть рекомендовано проведение ряда профилактических мер: диета с исключением из питания сахара, других повышающих сахар продуктов питания, дозированные физические нагрузки и т. д., а также постоянный контроль содержания сахара в крови.
- При отсутствии антител к β -клеткам поджелудочной железы обследуемым родственникам может быть рекомендован ряд профилактических мер, в том числе раз в полгода проводить исследование крови на наличие антител к β -клеткам поджелудочной железы.

6.3.3. Генетические детерминанты СД2

СД2 (инсулиннезависимый СД) обычно возникает как осложняющий симптомокомплекс, связанный с перееданием, ожирением, повышенной

выработкой инсулина (гиперинсулинизм). Характерными для него также является отсутствие специфических антител к β -клеткам островков Лангерганса, инсулина в поджелудочной железе, значительная частота семейных форм, в отличие от СД1, где их число не превышает 2–6% [184, 320]. Обобщенная схема патогенеза СД2 представлена на рисунке 6.3.9.

Патогенетическую основу СД2 составляют гиперинсулинемия и инсулинорезистентность. Остается, однако, неясным, является ли первичным в генезе СД2 инсулинорезистентность или дефект функции β -клеток. Существует немногочисленная (1–2%) группа больных СД2 с мутациями генов, принимающих непосредственное участие в обмене глюкозы и в синтезе инсулина. Однако в своем подавляющем большинстве причины СД2 остаются невыясненными. Поэтому уже в первых молекулярно-генетических исследованиях при анализе геной сети этого заболевания **учитывались как факторы, нарушающие секрецию инсулина и влияющие на метаболизм глюкозы, так и факторы, определяющие активность самого инсулина.** К первым относятся мутации *INS*-гена, гена глюкокиназы, транспортера глюкозы-4, рецептора сульфонилмочевины и некоторые другие. Вторая группа представлена генами инсулинового рецептора, гексокиназы, транспортера глюкозы-2, субстратом-1 IGF α [122].

Особый интерес для точной молекулярной диагностики СД2 могут представлять мутации, затрагивающие А- и В-цепи зрелого инсулина, приводящие к недостаточности или частичной функциональной неполноценности гормона. Если мутации нарушают нормальный процессинг гормона, вместо зрелого инсулина образуется неактивный проинсулин, что ведет к гиперпроинсулинемии [132, 184].

Другим важным кандидатом является ген рецептора инсулина, продукт которого представляет собой трансмембранный белок-рецептор, локализованный в плазматических мембранах клеток-мишеней многих тканей. Гетерозиготы по мутантным (полиморфным) вариантам этого гена обнаруживают сниженную способность к связыванию инсулина и, соответственно, характеризуются повышенным содержанием глюкозы в крови. Последний признак характерен и для мутаций генов, продукты которых обеспечивают транспорт глюкозы в ткани. Однако, как показывает опыт, самих по себе мутаций этих генов редко бывает достаточно для возникновения СД2. Скорее всего, они выступают в роли генетических триггеров, для реализации патологического эффекта которых необходимо наличие неблагоприятных аллелей других генов, а также действие пока малоизученных повреждающих факторов внешней среды.



Рис. 6.3.9. Принципиальная схема патогенеза сахарного диабета тип 2

В последнее время методом картирования количественных признаков — QTL (quantitative trait locus) было установлено достоверное генетическое сцепление СД2 с семью различными локусами на хромосомах 1, 2, 3, 10, 12 и 18 [147]. Важная информация о локализации и природе генов предрасположенности к СД2 была получена также с помощью просеивающего анализа однонуклеотидных повторов генома (SNP) в программе НарМар (GWAS метод). Идентификация самих генов предрасположенности внутри этих локусов представляет, однако, значительные трудности в связи с возможностью ген-генных (эпистатических) взаимо-

действий, меняющемся вкладе генов-кандидатов в генез заболевания при различных внешних воздействиях, а также наличия возрастзависимого эффекта [766]. Наконец, гены предрасположенности, установленные для больных СД2 в одних популяциях, зачастую не обнаруживают сцепления с СД2 при генетическом анализе других популяций, что свидетельствует о разном вкладе наследственных детерминант в СД2 у лиц разного этнического происхождения. Тем не менее к настоящему времени уже идентифицировано в общей сложности более 50 генов предрасположенности (чувствительности) к СД2 [273]. Наиболее значимым из них является ген *TCF7L2* (*TCF4*) — ядерный рецептор бета-катенина, который определяет уровень экспрессии инсулина и влияет на ответ при терапии сульфопрепаратами [273]. Для многих из них, однако, остается неясным, в какой мере они действительно вовлечены в этиопатогенез СД2, а в какой они ответственны за многочисленные осложнения в системе липидного обмена, водно-солевого гомеостаза, регуляции сосудистого тонуса, на фоне которых обычно и развивается СД2 (табл. 6.3.3).

6.3.4. Нутригеномика и диабет

Действие любого аллеля на фенотипический признак или его вклад в патологический процесс следует рассматривать в рамках его взаимодействия с другими генами, а также с факторами внешней среды, которые могут существенно влиять на процессы экспрессии генов и функции соответствующих белков. Важное, а зачастую решающее место в регуляции функций генома и, прежде всего экспрессии генов, принадлежит питанию, точнее, тем разнообразным химическим веществам, которые поступают с пищей. С учетом уже имеющегося клинического опыта, нет сомнения в том, что качеству и режиму питания принадлежит важное место в этиологии, патогенезе и в лечении СД. В настоящее время, когда генетика СД изучена уже достаточно детально, представляется вполне оправданным мнение авторитетных специалистов о том, что именно от нутригеномики (см. главу 7) следует ожидать наиболее важных успехов в профилактике и лечении СД как 1-го, так и 2-го типов [273, 715, 745]. Именно с помощью питания, точнее, строго «персонифицированной» диеты, составленной на основании результатов тестирования аллельных вариантов генов предрасположенности, представляется реальным отсрочить время манифестации заболевания и даже лечить его.

Рассмотрим уже существующие успехи диетотерапии в предупреждении СД и некоторые перспективы нутригеномики в этом направлении.

Таблица 6.3.3

Гены-кандидаты, определяющие предрасположенность к СД2 [273]

№	Ген	Название	Хромосома	Функция
1	<i>ABCC8</i>	Рецептор сульфонил-мочевины	11p15.1	Калиевые каналы
2	<i>ACPI</i>	Кислая фосфатаза-1	2p35	Фосфатаза
3	<i>ADA</i>	Аденозиндезаминаза	20q13.11	Энзим пуринового обмена
4	<i>ADRB2</i>	Адренергический рецептор-2	5q32-34	Рецептор катехоламина
5	<i>ADRB3</i>	Адренергический рецептор-3	8p12- p11.2	Регуляция липолизиса
6	<i>AGRP</i>	Гомолог белка «агути»	16q22	Антагонист меланокортина
7	<i>APM1</i>	Адипонектин (ACDC)	3q27	Гормон адипоцитов
8	<i>CPN10</i>	Кальпаин 10	2q37.3	Протеаза цистеина
9	<i>ENRP1</i>	Гликопротеин PC-1	6q22-q23	Ингибитор инсулинового сигнала
10	<i>FABP2</i>	Белок связывания жирных кислот	4q28-q31	Транспортер в/м жирных кислот печени
11	<i>FATP4</i>	Транспортер жирных кислот SLC27A4	Хр.9.	Транспортер в/м жирных кислот
12	<i>FOXc2</i>	Фактор транскрипции	16qй24.3	Регулятор метаболизма адипоцитов
13	<i>FRDA</i>	Фратаксин	9q13	Транспорт ионов в митохондриях
14	<i>GC</i>	Белок связывания витамина D	4q12	Регуляция уровня инсулина через витамин D
15	<i>GCGR</i>	Рецептор глюкагона	17q25	Гомеостаз глюкозы
16	<i>GCK</i>	Глюкокиназа печени	7q15-p13	Фермент гликолиза
17	<i>GFPT2</i>	Глютамин-фруктоза 6-Р аминотрансфераза	5q34-q35	Биосинтез гексозамина
18	<i>GHRL</i>	Грелин	3p26-p25	Гормон, гомеостаз энергии, питания
19	<i>GNB3</i>	Гуанин-нуклеотид связывающий белок	12p13	Сигнал тучности
20	<i>CYSI</i>	Гликоген-синтаза	19q13.3	Фермент, нарушение синтеза гликогена
21	<i>HNFI</i>	Печеночный ядерный фактор-1	12q24.2	Фактор траскрипции, гомеостаз холестерина

Таблица 6.3.3 (продолжение)

№	Ген	Название	Хромосома	Функция
22	<i>HNF4A</i>	Печеночный ядерный фактор-4	20q12-q13.1	Фактор транскрипции, запасы гликогена в печени
23	<i>IAPP</i>	Амилоидный белок инсулина — амилин	12p12.3p12.1	Гормон, глюкоза в поджелудочной железе
24	<i>IGF1</i>	Инсулиновый фактор роста-1	12q22-q24.1	Гормон роста
25	<i>IL6</i>	Интерлейкин-6	7q21	Цитокин
26	<i>INS</i>	VNTR инсулинового гена	11p15.5	Регуляция обмена глюкозы
27	<i>INSR</i>	Рецептор инсулина	19p13.2	Рецептор
28	<i>IPF1</i>	Промоторный фактор инсулина	12q12.1	Связь с промотором
29	<i>IRS1</i>	Субстрат рецептора инсулина 1	2q36	Сигнал трансдукции
30	<i>IRS2</i>	Субстрат рецептора инсулина 2	13q34	Сигнал трансдукции
31	<i>KCNJ11</i>	Калиевые прямые каналы Kir6-2	11p15.1	Калиевые каналы
32	<i>LIPC</i>	Печеночная липаза	15q21-q23	Регуляция липидов
33	<i>LIPE</i>	Гормон-чувствительная липаза	19q13.1-q13.2	Высвобождение жирных кислот
34	<i>LPL</i>	Липопротеинлипаза	8p22	Энзим; хиломикроны, триглицериды
35	<i>MAP-K8IP1</i>	Митоген, активатор протеинкиназы-8 — взаимодействие с белком 1	11p12p11.2	Сигнал трансдукции
36	<i>NeuroD1</i>	NeuroD/BETA2	2q32	Транскрипционный фактор
37	<i>PAII</i>	Ингибитор активатора плазминогена	7q21.2-q22	Свертывание крови
38	<i>PCK1</i>	Фосфоэнолпируваткарбоксикиназа 1	20q13.31	Регуляция глюконеогенеза
39	<i>PGSI</i>	Рецептор активации пролиферации пероксисом	14p15.1	Фактор транскрипции
40	<i>PIK3R1</i>	Регулятор субъединицы p85 фосфоинозитид-3-киназа	5q13	Клиренс глюкозы

Таблица 6.3.3 (окончание)

№	Ген	Название	Хромосома	Функция
41	<i>PON2</i>	Пароксоназа-2	7q21.3	Обмен глюкозы
42	<i>PPARG</i>	Рецептор γ -2 перокси-сом	3p25	Обмен глюкозы и липидов
43	<i>PP1R3A</i>	Субъединица 3A фосфатазы-1	7q11.23-q21.11	Обмен гликогена
44	<i>RORC</i>	RAR-рецептор C	1q21	Ядерный гормон, иммунный ответ
45	<i>RRAD</i>	Ras-белок диабета	16q22	Иммуночувствительность
46	<i>SLC2A2</i>	GLUT2-глюкоза	3q26.1-q26.3	Транспортер глюкозы
47	<i>SLC2A4</i>	GLUT4-глюкоза	17p13	Транспортер глюкозы
48	<i>TCF7L2</i>	Фактор транскрипции		Регулятор уровня глюкозы в крови
49	<i>TNF</i>	Фактор некроза опухоли	6p21.3	Провоспалительный цитокин
50	<i>UCP2</i>	Прерывающий белок 2	11p13	Митохондриальный транспортер

Проведенное несколько лет назад уникальное эколого-нутриентное (пищевое) исследование в 40 странах мира показало, что частота СД1 находится в прямой зависимости от энергетической ценности потребляемой пищи и в обратной — от доли растительной пищи в ежедневном рационе человека. На основании анализа уже имеющихся мировых данных основные пищевые продукты по степени их риска для развития СД1 подразделены на 3 основные группы: молоко и молочные продукты ($r = 0,80$, $p < 0,0001$), мясо ($r = 0,55$, $p < 0,001$), крупы ($r = -64$, $p < 0,001$). В плане профилактики СД1 особенно большое значение имеет питание ребенка в первые годы жизни. Обращено внимание на выраженный протективный эффект в отношении СД1 грудного молока, что позволяет настоятельно рекомендовать его использование в период перевода ребенка на различные питательные смеси.

Важно также отметить, что провоцирующий СД1 эффект коровьего молока и молочных смесей, равно как питательных зерновых (крупяных) прикормов для новорожденных, обычно проявляется только при наличии определенной наследственной предрасположенности. Установлено, в частности, что антитела к β -клеткам поджелудочной железы определяются преимущественно у детей, имеющих неблагоприятные

сочетания «предрасполагающих» *S*-аллелей генов *DQA1* и *DQB1* (см. раздел 6.2.1). На фоне неблагоприятных аллелей гена *INS* существенно чаще развивается СД1 и в случае употребления животных белков, главным образом мяса. Провоцирующим СД1 фактором является также повышение калорийности питания. Таким образом, именно нутригеномике принадлежит решающая роль в первичной профилактике СД1. Есть основания думать, что использование разработанного алгоритма тестирования наследственной предрасположенности к СД1 (см. рис. 6.3.8), а также достижений современной нутригеномики позволит в значительной мере приблизиться к решению проблемы СД.

При наличии СД1 тестирование соответствующих полиморфных маркеров генов окислительного стресса (*SOD2*, *SOD3*, *CAT*, *NOS2*) позволяет оценить вероятность развития сосудистых и неврологических осложнений и начать их своевременную профилактику. Тестируя полиморфизм генов, контролирующих сосудистый тонус (*ACE*), а также ряда генов липидного обмена (*APOB*, *APOE*), можно определить вероятность развития и начать своевременную индивидуальную профилактику возможной диабетической нефропатии.

Не менее важен потенциальный вклад генетического тестирования и нутригеномики в профилактику и лечение СД2. Известно, что у одних больных СД2 легко корректируется диетой, изменением образа жизни или назначением тех или иных препаратов в зависимости от результатов лабораторных тестов. У других такое лечение оказывается малоэффективным. Поэтому считается, что решающим фактором на пути оптимизации лечения, его персонификации, является молекулярно-генетическое тестирование генов предрасположенности [273, 715]. Естественно, что сведения о генетических особенностях индивида, полиморфных аллельных маркерах генных сетей СД2 следовало бы, так же как и в случае СД1, иметь уже при рождении. Такая информация, полученная заранее, позволяет глубже понять особенности реакции индивидуального организма на диету и другие внешние факторы, в том числе оптимизировать лекарственную терапию заболевания.

Стремительный рост тучности и неизменно сопутствующего ожирению СД2 свидетельствует не только о наличии генетической предрасположенности к этим недугам значительной части населения планеты, но и о том, что с помощью специальных диет и здорового образа жизни можно реально воздействовать на эти грозные демографические показатели [314, 715].

Как уже отмечалось, генная сеть СД2 включает в себя несколько самостоятельных групп, контролирующих не только метаболизм глюкозы, но также обмен инсулина, липидов, водно-солевой гомеостаз тканей, давление крови, иммунные реакции и пр. Логично предполагать, что у каждого больного, особенно на ранних стадиях СД2, в определенной мере будет страдать та или другая генетически и, соответственно, функционально наиболее ослабленная метаболическая система. Поэтому своевременное выявление генетически слабого звена — необходимое условие правильно организованной персонифицированной лекарственной и диетотерапии СД2.

Таким образом, как и в случае СД1, система профилактики СД2 должна начинаться с тестирования аллельных вариантов генов предрасположенности, с последующим отбором лиц групп высокого риска и их научно обоснованным мониторингом. Определенная сложность в отношении СД2 заключается в его достаточной генетической «размытости». Поэтому, учитывая сравнительно высокую частоту семейных случаев СД2, логично уже на первом этапе провести генетическое тестирование больного в семье высокого риска СД2, определить у него этиологически наиболее вероятные сочетания неблагоприятных аллелей и только затем тестировать соответствующие генетические маркеры у потомков.

Следует иметь в виду, что генетика СД, равно как и генетика других мультифакториальных заболеваний, несмотря на очевидные успехи в идентификации генов предрасположенности, все еще находится в начале своего пути. Сложность ген-генных взаимодействий, наличие метаболических «буферных» систем (компенсация функциональной неполноценности одного аллеля другим геном той же метаболической цепи), эпигенетические факторы (метилирование цитозиновых нуклеотидов, ремоделирование хроматина) существенно затрудняют объективную интерпретацию результатов генетического тестирования. Тем не менее только по пути масштабных исследований популяционных частот генов-кандидатов мультифакториальных заболеваний, всестороннего изучения их ассоциаций с соответствующими болезнями можно приблизиться к широкому внедрению данных современной генетики в медицину [273, 745]. На этом основании вполне оправданно и широкое использование уже имеющихся данных по генетике СД1 и СД2 для профилактики и лечения этих тяжелых мультифакториальных заболеваний. Важная роль в их лечении, особенно СД2, принадлежит нутригеномике, которая предоставляет большие возможности для улучшения качества жизни путем прогностического тестирования генов, ассоциированных с определенными компонентами пищи.

Необходимы дальнейшие масштабные исследования взаимодействий ген–диета–заболевание в условиях международного сотрудничества и на различных популяциях для разработки более детальных программ персонализированных диетотерапий для больных СД2. Именно специалисты по нутригеномике трансформируют высокую науку генетику в практику и смогут оптимизировать здоровье пациентов [745].

Заключение

Приведен обзор современных данных по генетике сахарного диабета (СД) типа 1 и типа 2, роли генетического тестирования маркерного аллельного полиморфизма генов-кандидатов, функционально неблагоприятные аллели которых могут предрасполагать к этим мультифакторальным заболеваниям. Суммированы и кратко рассмотрены гены, ассоциированные с СД1 (более 20) и с СД2 (более 50), факторы внешней среды, провоцирующие развитие этих болезней, а также системы генов, ассоциированные с наиболее частыми и тяжелыми осложнениями СД1. Отмечена большая роль нутригеномики в профилактике и в рациональном персонализированном лечении СД. Предложены перспективные алгоритмы генетического тестирования наследственной предрасположенности и рассмотрены возможности персонализированной диетотерапии в профилактике и лечении СД1 и СД2.

6.4. НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Введение

Заболевания нервной системы с выраженным наследственным компонентом весьма многочисленны. Анализ экспрессионных профилей свидетельствует о том, что в нервной ткани человеческого организма транскрибируется до 17% всех генов, то есть в несколько раз больше, чем в любой другой. Вполне естественно поэтому, что фенотипическим проявлением многих генных и практически всех хромосомных мутаций являются различные нарушения ЦНС. В настоящее время известны сотни наследственных заболеваний с выраженными нейродегенеративными проявлениями, которые имеют семейный характер и наследуются по моногенному типу, другие являются преимущественно спорадическими, но встречаются и как достаточно редкие моногенные варианты. Наконец, третьи представляют собой типичные мультифакторные заболевания с варьирующимися в широких пределах наследственными и экзогенными составляющими.

Весьма сходные по конечному клиническому проявлению нейродегенеративные заболевания (**НДЗ**) в действительности могут представлять собой фенкопии, индуцированные повреждающими внешними факторами, результатом взаимодействия определенных генов предрасположенности с неблагоприятными экзогенными факторами и, наконец, быть прямым следствием наличия мутаций в единичных генах.

Подробно с молекулярными основами многих НДЗ можно ознакомиться в серии монографий и руководств [87, 107, 120]. Генетическое тестирование некоторых НДЗ, особенно тех, для которых характерна поздняя клиническая манифестация, предполагается в разработанных нами Генетическом паспорте и Генетической карте репродуктивного здоровья (см. главу 7). Тестирование мультифакториальных вариантов НДЗ позволяет оценить величину индивидуального риска, наметить пути профилактики и, возможно, в ближайшем будущем, даже лечения [30, 34, 39].

В главе суммированы данные о молекулярных основах наследственной предрасположенности и профилактике некоторых наиболее известных НДЗ моногенной природы (хорея Гентингтона), смешанного моногенного и мультифакториального генеза (болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера) и типичной мультифакториальной патологии — рассеянного склероза.

6.4.1. Хорея Гентингтона (ХГ)

ХГ — типичный представитель весьма обширной группы НДЗ, относящихся к так называемым болезням экспансии, молекулярную основу которых составляет особый, характерный только для человека, тип мутаций, получивших название «динамические». В настоящее время эта группа насчитывает около 20 разных болезней, характерными для которых являются те или иные нейродегенеративные нарушения ЦНС. Мутации, вызывающие болезни экспансии, представляют собой микросателлитные нуклеотидные повторы, состоящие из 3–9 нуклеотидов. Повторы имеют разный нуклеотидный состав, располагаются внутри или вне кодирующих последовательностей гена, могут транслироваться до белкового продукта или не транслироваться. Динамические мутации существенно искажают работу гена либо в сторону его гиперактивности (гиперпродукция белка), либо в сторону угнетения его экспрессии. Подробно варианты динамических мутаций, типы нарушений генной экспрессии и особенности их клинического проявления рассмотрены в соответствующих обзорах, сводках и монографиях [30, 39, 86, 107, 108].

ХГ относится к полиглутаминовым болезням, обусловленным экспансией полиглутамин-кодирующих CAG-повторов в транслируемых областях различных генов. Причиной ХГ является «динамическая» мутация гена *IT-15*, расположенного на дистальном конце короткого плеча хромосомы 4 (4p16.3). Заболевание встречается с частотой 8 на 100 000 и наследуется по аутосомно-доминантному типу. В норме в структуре кодирующей и транслируемой части гена *IT-15* присутствует до 36 CAG-повторов и, соответственно, в молекуле белка гентингина (продукта *IT-15* — Htt) до 36 глутаминовых остатков. Экспансия CAG-триплетов свыше 39–40 и соответствующее возрастание числа глутаминовых остатков приводит к появлению патологичного мутантного белка mHtt (рис. 6.4.1). Тяжесть клинической картины существенно нарастает в следующем поколении (эффект антиципации), особенно при передаче мутации по мужской линии. В настоящее время известно, что мутантный белок Htt (mHtt), благодаря наличию полиглутаминового тракта, образует особые шпильчатые структуры и протяженные антипараллельные β -тяжи, устойчивые к ферментам-каспазам, разрушающим в норме его аминокислотную структуру (Caspase 2, Caspase 6). Фрагменты mHtt агрегируют и преципитируют в цитоплазме нейронов, блокируют действие универсального фактора транскрипции SP1, нарушают функции белков-регуляторов апоптоза, снижают экспрессию нейротрофического фактора BDNF (brain-derived neurotrophic factor), следствием чего и является гибель нейронов полосатого ядра, фронтальных отделов мозга, базальных ядер и хвостатого ядра. Подробно с последними данными по изучению молекулярной природы этиопатогенеза ХГ можно ознакомиться в ряде последних обзоров, монографий и на соответствующем сайте Интернета [<http://en.wikipedia.org/wiki/Huntington%27sdisease>].

Современная профилактика ХГ достигается с помощью своевременного (до наступления беременности) медико-генетического консультирования семей высокого риска и проведения пренатальной диагностики (ПД). При этом основную сложность представляет само медико-генетическое консультирование потенциально больных взрослых, желающих провести или уже прошедших молекулярную диагностику в досимптоматический период [120]. Учитывая серьезные этические трудности медико-генетического консультирования родителей, предпочтительной представляется ПД еще в доимплантационный период в условиях клиники вспомогательных репродуктивных технологий. Естественно, селекция потенциально больных эмбрионов вне организма и пересадка в

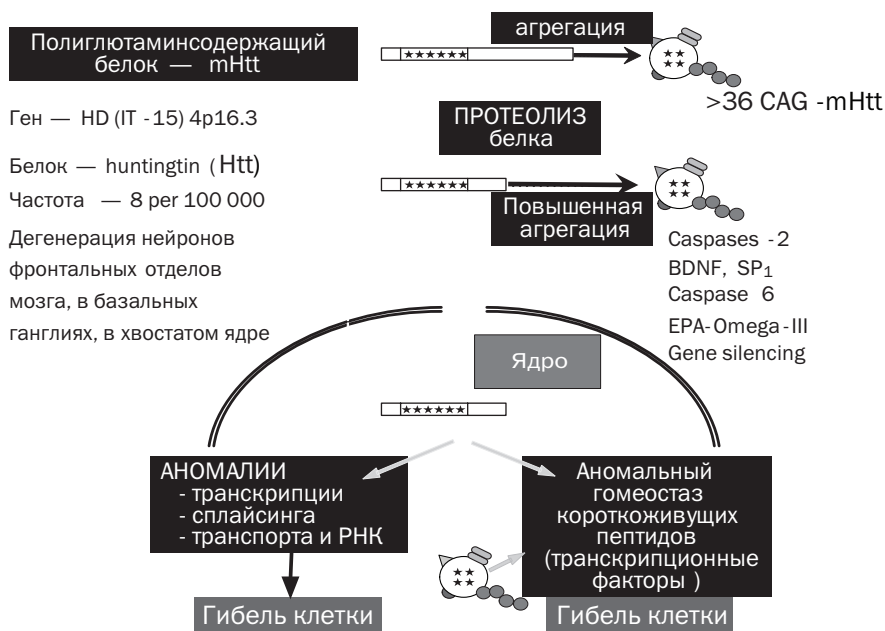


Рис. 6.4.1. Основные молекулярные механизмы патогенеза хореи Гентингтона (пояснения в тексте)

матку заведомо здоровых, не несущих мутации в гене *IT-15*, существенно облегчает решение многих этических и моральных проблем, часто возникающих при медико-генетическом консультировании семей высокого риска с этой смертельной патологией [167].

Радикальное средство лечения ХГ неизвестно. Перспективными считаются массивированная антиоксидантная терапия, блокада допаминовых рецепторов и, что особенно важно, блокада кальциевых рецепторов нервных клеток мозга. Как показывают последние исследования, повышение концентрации ионов кальция в мозге является основной причиной гибели нервных клеток.

Следует обратить внимание и на большие успехи мировой науки в разработке эффективных путей лечения ХГ с помощью технологии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и методов генной терапии [657]. Успешно завершены опыты по терапии ХГ с помощью ЭСК на биологической модели ХГ у приматов. Многообещающими выглядят доклинические испытания на биологических моделях и методов генной терапии. В частности, достигнут эффективный блок первичного патологического продукта экспрессии мутантного гена *IT-15* с помощью спе-

цифичных коротких siRNA или shpRNA, доставленных в клетки мозга непатогенным для человека аденоассоциированным вирусом.

6.4.2. Болезнь Паркинсона

В отличие от достаточно редкой ХГ болезнь Паркинсона (БП) относится к числу весьма распространенных НДЗ. Согласно мировым данным, она встречается почти у 2% лиц, достигших 50–60-летнего возраста. Основные клинические проявления заболевания (мышечная ригидность, тремор, брадикинезия — малоподвижность) обусловлены прогрессивной гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (черного ядра) субталамической области мозга. Клинические симптомы заболевания начинают манифестировать, когда в подкорковых отделах мозга остается только около 5% дофамин-продуцирующих нейронов. Естественно, что досимптоматическое выявление этой патологии и своевременная, возможно и упреждающая, терапия могла бы существенно задержать манифестацию этого тяжелого инвалидирующего НДЗ. К сожалению, этиология и патогенез БП достаточно сложны и многие молекулярные аспекты патологического процесса остаются невыясненными. В частности, до сих пор нет ответа, почему БП вдвое чаще встречается у мужчин, чем у женщин [111, 215].

Патогенетические аспекты БП весьма гетерогенны. Только 15–20% случаев БП относятся к семейным формам, то есть имеют наследственную природу. Основная часть представлена спонтанными (идиопатическими) случаями, в которых наследственная предрасположенность реализуется только на фоне определенных провоцирующих факторов внешней среды. К ним относятся пестициды (ротенон), вещества, обладающие нейротоксическим действием (пиридины), оксидативный стресс, соли тяжелых металлов, травмы головы и многое другое. В частности, с помощью митохондриального яда 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридина, вызывающего селективную гибель дофаминергических нейронов, удается направленно получить биологическую модель БП на крысах [111].

Таким образом, есть все основания рассматривать большую часть случаев БП как типичное мультифакторное заболевание. Список генов, вовлеченных в моногенные и мультифакторные формы БП, приведен на рисунке 6.4.2.

Моногенные формы БП

В настоящее время идентифицированы 7 генов, мутации которых обуславливают моногенные варианты БП, два из которых наследуются

Моногенные (семейные) формы — 15–20 %

SNCA (ад), *PARK2* (ар), *UCHL1*, *LRRK2* (ад), *PINK1* (ар–М),
DJ1 (ар) (ар), *ATP13A2* (*PARK 1–12*)

Спорадические случаи 80–85 %**Гены оксидативного стресса**

SOD1, *SOD2*, *MTHFR*, митохондриальные гены

Гены системы детоксикации

GSTM1, *GSTT1*, *GSTP1*, *PON1*, *NAT2*, семейство
цитохромов P450

Гены синтеза и деградации дофамина

MAOA, *MAOB*, *TH*, *COMT*, *DAT1*, *DRD3*, *DRD4*, *DRD5*

Рис. 6.4.2. Гены, ассоциированные с моногенными и мультифакториальными формами БП (пояснения в тексте)

по аутосомно-доминантному (АД) — *SNCA*, *UCHL1*, *LRRK2*, а остальные — по аутосомно-рецессивному типу (АР): *PARK2*, *PINK1*, *M*, *DJ*, *ATP13A2*.

Наиболее известным в этой серии является ген белка нейронов α -синуклеина (***SNCA***, второе название гена — ***PARK1***), локализованный в локусе 4q21. Мутации в этом гене приводят к аутосомно-доминантной форме БП. Преобладающей мутацией, приводящей к гиперпродукции белка α -синуклеина, оказалась дупликация или даже трипликация гена *SNCA*. Вследствие избытка белка и изменения его конформационных свойств нарушаются процессы протеосомной деградации α -синуклеина, что приводит к образованию в нейронах эозинофильных цитоплазматических включений, так называемых **телец Леви**. Предполагается, что нейрофибриллярные агрегаты олигомеров α -синуклеина обладают токсическим действием и вызывают гибель нервных клеток. БП также может быть результатом различных точечных мутаций в гене *SNCA*, которые встречаются редко и, как правило, ограничены отдельными семьями [111; <http://en.wikipedia.org/wiki/Parkinson%27sdisease>].

Значительно чаще причиной моногенных форм БП являются мутации в гене ***PARK2***, которые приводят к ювенильной форме заболевания, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу. Морфологической особенностью этой формы является отсутствие телец Леви. Непосредственной причиной заболевания является нарушение протеосомной деградации белков. Ген *PARK2* расположен в локусе 6q25.2–q27, содержит 12 экзо-

нов, кодирует белок **паркин**, состоящий из 465 аминокислот. Он играет важную роль в конъюгации белков с убиквитином и их последующей деградации в протеосомах. Мутации гена *PARK2* широко распространены в различных популяциях, обнаруживают характерный этнический паттерн, являются причиной около половины всех семейных (наследственных) форм БП в некоторых популяциях. В серии работ отечественных авторов под руководством профессора Е. И. Шварца у 50 лиц с БП Северо-Западного региона России мутации в гене *PARK2* были выявлены у 7,5% пациентов. Помимо единичных точечных мутаций были обнаружены делеции отдельных экзонов [102, 111]. Примерно с такой же частотой мутации в гене *PARK2* регистрировались в популяции жителей Москвы и Центрально-Черноземного района России [612]. Сделан вывод, что скрининг мутаций в гене *PARK2* имеет диагностическую значимость и может использоваться для подбора адекватной терапии, но только в семьях с аутосомно-рецессивным вариантом паркинсонизма, особенно в случаях раннего (около 20 лет) начала заболевания.

Аутосомно-рецессивный тип наследования имеет БП и при мутациях других, уже идентифицированных генов. В частности, гена *DJ-1* (*PARK7*, *1p36*), на долю мутаций которого приходится около 1% случаев БП с ранним началом. Считается, что белок, кодируемый геном *DJ-1*, защищает нейроны от токсического действия олигомеров α -синуклеина и препятствует развитию окислительного стресса.

Около 2% семейных случаев БП с ранним началом обусловлены мутациями в гене митохондриального белка **РТЕН-индуцированной киназы** — *PINK1* (*PARK6*, локализованного в *1p35-36*). Считается, что мутации в этом гене нарушают функции митохондрий, что делает нервные клетки более чувствительными к оксидативному стрессу, способствует включению процесса запрограммированной клеточной гибели — программы апоптоза.

Аутосомно-доминантный тип наследования характерен и для мутаций в гене *LRKK2* (*PARK8*, *12p11.2-q11.3*), которые, как недавно установлено, встречаются особенно часто как при семейных, так и при спорадических формах БП, а некоторые из них (G2019S и R1441C), безусловно, являются мажорными [357, 614]. Так, мутация G2019S гена *LRKK2* встречается у 6% пациентов с БП в случае семейных форм и 1,6% — при спорадических формах. Среди семейных форм некоторых этнических групп (евреи-ашкенази) эта мутация встречается чуть ли не у каждого третьего пациента. Тестирование данной мутации рекомендовано для всех семей-

ных случаев БП в США с целью досимптоматического выявления лиц с высоким риском заболевания [784]. Ген *LRRK2* кодирует белок дардарин, функции которого пока не выяснены. Имеются данные о тесном взаимодействии дардарина с белком паркином и с белком синфилином-1, который, подобно α -синуклеину, входит в состав белков телец Леви.

Отсутствие БП у некоторых носителей мутации гена *LRRK2* свидетельствует о его неполной пенетрантности и о возможной роли повреждающих экзогенных факторов или наличия эндогенных факторов (неблагоприятных аллельных вариантов генов предрасположенности), провоцирующих развитие заболевания.

При исследовании мажорных мутаций у 222 больных БП в России мутация G2019S выявлена у 6 больных, относящихся к евреям-ашкенази. Другая мажорная для других популяций мутация R1441C обнаружена у одного больного. Делается вывод о целесообразности тестирования мутаций в гене *LRRK2* в России с целью верификации клинического диагноза БП [141].

Мультифакториальные формы БП

Напомним, что подавляющее большинство случаев БП имеют спонтанное происхождение и являются результатом взаимодействия генов предрасположенности с токсическими факторами внешней среды. Ранее отмечалось, что важная роль в генезе БП принадлежит различным экзогенным токсинам, поражающим непосредственно дофаминэргические нейроны черной субстанции (ЧС), либо провоцирующим окислительный стресс, вызывающий их гибель. Можно выделить три основные группы генов (рис. 6.4.2): гены окислительного (оксидативного) стресса (1), гены системы детоксикации ксенобиотиков (2) и гены, обеспечивающие метаболизм дофамина (3).

1. Гены первой группы представлены генами супероксиддисмутаз (*SOD1* и *SOD2*), геном метилтетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), а также некоторыми митохондриальными генами.

Функционально ослабленные аллельные варианты генов *SOD1* и *SOD2*, термолабильная форма гена *MTHFR* (*T*-аллель полиморфизма T677C) и мутации генов белков митохондрий, приводящие к оксидативному стрессу или провоцирующие его, рассматриваются как наследственные факторы предрасположенности к БП.

2. В равной или даже в большей степени предрасположенность к БП зависит от состояния генов системы детоксикации (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *PON1*, *NAT2*, семейство генов цитохромов P450). Влияние на

частоту БП экологического состояния регионов, степени загрязнения хлорсодержащими пестицидами, гербицидами, фунгицидами, солями металлов (магния, железа) и даже отдельных химических соединений (органические производные пиридина) доказывает важную роль генов системы детоксикации в патогенезе БП.

3. Наконец, накапливается все больше данных об участии в генезе БП неблагоприятных аллельных вариантов многочисленных генов, непосредственно вовлеченных в синтез и разрушение дофамина (*MAOA*, *MAOB*, *GAD*, *TH*, *COMT*, *DAT1*, *DRD3*, *DRD4*, *DRD2*, *DRD5*). Ингибиторы моноаминоксидазы — продукты генов *MAOA* и *MAOB* — блокируют распад дофамина, секретируемого дофаминергическими нейронами и широко используются для медикаментозной терапии БП, а ген *GAD* проходит клинические испытания для генной терапии БП [718].

Результаты мета-анализа многих исследований подтверждают достоверную ассоциацию с БП определенных аллелей генов моноаминоксидазы (*MAOB*), *N*-ацетилтрансферазы (*NAT2*), глутатион-S-трансферазы T1 (*GSTT1*), митохондриальной тРНК^{Glu}, параоксаназы 1 (*PON1*), ядерного рецептора Nurr1 [247, 613, 787, 819].

В некоторых исследованиях такая ассоциация подтверждалась только при анализе отдельных групп больных. Так, в случае глутатион-трансферазы T1 (*GST1*) достоверная ассоциация с БП была выявлена только у больных, имевших контакт с пестицидами [649].

Суммируя все вышеизложенное, следует отметить, что в основе БП лежит нарушение продукции и гибель дофамин-продуцирующих нейронов ЧС субталамической области мозга, вызванное образованием токсичных агрегатов α -синуклеина и их повышенной чувствительностью к оксидативному стрессу. Предиктивное тестирование семейных форм БП касается скрининга мажорных мутаций в гене *LRRK2*, а при ранней манифестации клинических симптомов БП (до 45 лет) — в гене *PARK2*. Определенную прогностическую значимость в оценке риска спонтанных (идиопатических) форм БП может иметь тестирование функционально неблагоприятных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков и генов метаболизма дофамина.

6.4.3. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БАл) (старческое слабоумие) — самое распространенное НДЗ ЦНС. Среди лиц 65-летнего возраста симптомы БАл встречаются у 2–3 %, а к 85 годам — вплоть до 50 %, то есть каждые 5 лет

МОНОГЕННЫЕ (семейные) формы

PS1 (тяжелое течение), *PS2* — пресинелиновые гены (раннее начало)

APP — амилоидный белок $\beta 42$

МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫЕ (спорадические) формы

APO E4 — главный фактор риска БАл

SORL1, *IL6*, *IL1A*, *IL1B* & *TNFs*

$TNF\alpha + Inf\gamma$ = индукция синтеза токсического $A\beta 42$

Вредные экологические факторы (дефолианты)

Повторные травмы головы, частые мигрени

Рис. 6.4.3. Гены, ассоциированные с моногенными и мультифакториальными формами болезни Альцгеймера (пояснения в тексте)

после 65 риск БАл удваивается. Главные клинические симптомы заболевания включают в себя нарушения краткосрочной памяти и прогрессирующую деменцию [216]. БАл может иметь чисто наследственную природу и проявляться как типичное моногенное заболевание либо являться результатом взаимодействия генов предрасположенности с неблагоприятными факторами внешней среды. Гены, мутации которых приводят к наследственной форме БАл, и гены-кандидаты ее мультифакториальной формы приведены на рисунке 6.4.3.

Моногенные формы БАл

Семейные формы БАл наследуются по аутосомно-доминантному типу. Могут быть следствием мутаций по крайней мере трех различных генов: двух пресинелиновых *PS1* и *PS2*, ассоциированных с ранними и наиболее агрессивными формами БАл, и гена *APP*, локализованного на хромосоме 21 и ответственного за синтез белка-предшественника амилоида — App. Повышенное содержание этого белка в головном мозге больных с синдромом Дауна, по всей видимости, и объясняет тяжелую необратимую задержку умственного развития у таких пациентов. Известно также, что продукты пресинелиновых генов принимают участие в протеолитических механизмах расщепления амилоидного белка до β -амилоида.

В настоящее время в гене *APP* идентифицировано более 20 различных мутаций, нарушающих процессинг App-белка и способствующих быстрому накоплению пептида $A\beta 42$, фибрилльные агрегаты которого нарушают гомеостаз кальция и включают программу апоптоза нейронов во фронтальных, височных и других отделах мозга в случае БАл. Появление амилоидных (синелиновых) бляшек, образованных преимущественно фибриллярными агрегатами олигомеров β -амилоида в меж-

нейронных пространствах и в стенках мозговых сосудов, в настоящее время рассматривается как главный пусковой механизм токсических процессов, ведущих к прогрессивной гибели нейронов. Другой важный патогенетический механизм БАл заключается в активации синтеза и накоплении гиперфосфорилированных белков микротрубочек (таубелков), которые формируют в цитоплазме нейронов фибриллярные пучки, нарушающие трофику нервных клеток. Последние экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о том, что именно амилоидные бляшки являются первичным и основным патогенетическим механизмом БАл. На долю наследственных, моногенных форм БАл приходится не более 3–5 % всех случаев этого заболевания. Остальные, по всей вероятности, имеют мультифакториальную природу.

Главным геном предрасположенности к БАл считают аллель 4 гена *APOE* (*APOE4*) [772]. Другие гены предрасположенности включают гены цитокинов *IL6*, *ILA*, *ILB* и *TNFA*. Установлен синергический эффект определенных аллелей гена *TNFA* и гена *INF-Y* в потенцировании формирования амилоидных бляшек. Отмечена также выраженная ассоциация с БАл полиморфизма промоторной области гена *TNFA* (*rs179724-T*-аллель) и его синергизм с аллелем *APOE4* [772]. Помимо возраста, факторами риска развития БАл, являются низкий уровень тестостерона, травмы головы, нарушения кардиоваскулярной системы, связанные с диабетом, курением, гипертонией, высоким уровнем холестерина. Среди повреждающих экзогенных факторов важную роль отводят солям легких металлов, особенно солям алюминия, высокие концентрации которого присутствуют в ткани мозга больных БАл, а также солям меди [803].

6.4.4. Рассеянный склероз (РС)

РС — типичное аутоиммунное заболевание полигенного (мультифакториального) генеза. По некоторым оценкам, РС в мире болеют около 1 млн человек, только в США их число достигает 350 000. При этом женщины болеют РС почти вдвое чаще, чем мужчины [389].

Известно, что заболевание зачастую начинается в юношеском возрасте и патогенетически представляет собой ремитирующий аутоиммунный процесс, направленный против белого вещества мозга, главным образом, белка миелина. Возникающие очаги воспалительного процесса в мозге приводят к появлению очагов демиелинизации, сопровождаются гибелью нейронов и их отростков — аксонов. Причина РС до настоящего времени остается загадочной. Вместе с тем проведенный

ГЕНЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

- *DRB1*, *OPN*, *CD44*, *CD24*, *CCR 5del32* — гены иммунной системы
- *MBP*, *CTLA4*, *ICAM1* — гены обмена миелина
- *TGFB1*, *TNF* — цитокины
- *ILR4*, *TCR β*, *PTAFR* — рецепторы

Аллельные комбинации генов (гаплотипы), ассоциированные с РС в России (Favorova et al., 2006)

- -509 *TGFB1*, *C DRB*18(3)*, *CTLA4*G*
- -238 *TNF*B1*, *308TNF*A2*, *CTLA4*G*

Рис. 6.4.4. Основные гены-кандидаты патогенеза рассеянного склероза (пояснения в тексте)

сравнительно недавно анализ экспрессионных профилей многих генов в поврежденных очагах мозга больных РС с помощью микрочиповой технологии позволил впервые получить полное представление о сложных механизмах аутоиммунных реакций, происходящих в мозге у таких больных [714]. В частности, было установлено, что болезнь сопровождается существенными изменениями работы 432 генов мозга. При этом активность экспрессии 54 генов возрастает более чем в 2,5 раза.

В настоящее время считается, что РС относится к полигенным мультифакториальным заболеваниям аутоиммунного генеза. Многочисленные исследования по анализу генетики РС доказывают сложность генетической составляющей этого заболевания [389]. Генные сети и гены-кандидаты, аллельные варианты которых вовлечены в патогенез РС, приведены на рисунке 6.4.4.

Важным итогом этих исследований явилась идентификация в очагах поражения высоких концентраций мРНК гена провоспалительного белка остеопонтина (*OPN*), активно вырабатываемого клетками глии. Именно продукция остеопонтина не только клетками глии, но и самими нейронами, провоцирует процессы воспаления и демиелинизации в ЦНС и определяет тяжесть заболевания. Другой важный ген-кандидат РС — *CD44*, белковый продукт которого является лигандом для белка остеопонтина. Важная роль в инициации и поддержании аутоиммунного процесса отводится цитокинам — интерлейкину-23 (*IL-23*), интерферону- γ (*INF γ*), фактору некроза опухоли α (*TNF- α*). Высокая степень ассоциации с РС показана и для гена *CD24*. При исследовании 242 пациентов найдена высокая степень ассоциации одного из аллелей этого гена с РС.

Достоверная ассоциация с РС отмечена и в отношении генов класса *II DRB1* главного локуса гистосовместимости *HLA* [389]. В обширных

исследованиях, проведенных по схеме случай–контроль, установлена четкая ассоциация между РС и гаплотипом *DRB1*1501/DQA1*0102/DQB1*0602 –DQB1* [489, 537].

Исследования отечественных авторов подтверждают ассоциацию РС с генами *DRB1*5(2)* и *TNFA* и свидетельствуют о наличии в *HLA*-локусе двух независимых ДНК-маркеров РС [280, 771]. Установлена устойчивая ассоциация РС с различными сочетаниями генов класса *DRB1** и других: *TCRβ*, *TGFB1*, *CTLA4*, *ICAM-1*, *ILR4*, а также с делеционной формой *CCR5del32* и гена основного белка миелина (*MBP*) [615]. Выявлены неслучайные комбинации нескольких аллелей разных генов, ассоциированных с РС. В частности, устойчивые ассоциации с РС отмечены для нескольких аллельных вариантов трех генов – *509TGFB1*С*, *DRB1*18(3)*, *CTLA4*G* и – *238TNF*B1*, – *308TNF*A2*, *CTLA4*G* [767].

Имеющиеся данные свидетельствуют о сложности генной сети РС. Реальными генами-кандидатами, аллели которых или их сочетания предрасполагают к РС, являются гены главного локуса гистосовместимости *HLA DRB1*, а также цитокинов *TGFB1*, *TNF*, *ILR4* и гены-модуляторы иммунного ответа *CD44*, *CD24*, *OPN*.

Заключение

Анализ имеющихся данных по четырем различным нейродегенеративным заболеваниям (ХГ, БП, БАл и РС) свидетельствует о разном вкладе наследственной компоненты и повреждающих факторов внешней среды в их этиологию. В случае ХГ мы имеем дело с типичным моногенным заболеванием, наследуемым по аутосомно-доминантному типу, молекулярную основу которого составляет динамическая мутация *CAG*-повтора в транскрибируемой и транслируемой части гена. Тяжесть заболевания и сроки его манифестации зависят, главным образом, от числа глутаминовых остатков в продукте мутантного гена — белке гентингтине, а также от наличия неблагоприятного для прогноза ряда заболеваний ЦНС аллеля 4 гена *APOE*. Прогноз заболевания особенно неблагоприятен при наследовании ХГ по мужской линии. Основным способом профилактики ХГ является пренатальная диагностика. Учитывая этические трудности медико-генетического консультирования при ХГ следует приветствовать разработку и внедрение доимплантационного метода диагностики ХГ. Условия клиники ЭКО позволяют заранее отобрать эмбрионы, не имеющие динамической мутации, и, соответственно, пересадить в матку только заведомо здоровые по гену *IT-15* эмбрионы.

В основе БП лежит нарушение продукции и гибель дофамин-продуцирующих нейронов черной субстанции мозга, вызванное образованием токсичных агрегатов α -синуклеина и их повышенной чувствительностью к оксидативному стрессу. Предиктивное тестирование семейных форм БП касается скрининга мажорных мутаций в гене *LRRK2*, а при ранней манифестации клинических симптомов БП (до 45 лет) — в гене *PARK2*. Определенную прогностическую значимость в оценке риска наиболее частых спонтанных (идиопатических) форм БП может иметь тестирование функционально неблагоприятных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков и генов метаболизма дофамина. Наибольшего внимания в качестве потенциальных генов-маркеров для предиктивного тестирования заслуживают гены моноаминоксидазы (*MAOB*), N-ацетилтрансферазы (*NAT2*), глутатион-S-трансферазы T1 (*GSTT1*), пароксаназы 1 (*PON1*), ядерного рецептора Nurr1. Подобно БП, основное число случаев БАл имеет мультифакториальную природу. Главным геном предрасположенности к БАл считают аллель 4 гена *APOE*. Другие гены предрасположенности включают гены цитокинов *IL6*, *IL4*, *ILB* и *TNFA*. Отмечена выраженная ассоциация с БАл полиморфизма промоторной области гена *TNFA* (rs179724-T-аллель) и его синергизм с аллелем *APOE4*. Тестирование предрасположенности к БАл и БП возможно только при наличии выраженных факторов риска к этим инвалидизирующим заболеваниям. К таковым относятся работа на вредных химических производствах, частые контакты с пестицидами, низкий уровень тестостерона, травмы головы, нарушения сердечно-сосудистой системы, связанные с диабетом, курением, гипертонией, высоким уровнем холестерина. Среди повреждающих экзогенных факторов важную роль отводят солям легких металлов, особенно солям алюминия, высокие концентрации которого присутствуют в ткани мозга больных БАл.

Реальными генами-кандидатами, аллели которых или их сочетания предрасполагают к РС, являются гены главного локуса гистосовместимости *HLA DRB1*, а также цитокинов *TGFB1*, *TNF*, *ILR4* и гены-модуляторы иммунного ответа *CD44*, *CD24*, *OPN*.

Важно отметить, что в связи с поздней манифестацией, отсутствием методов эффективного лечения и четко установленных ассоциаций генов-кандидатов с рассмотренными НДЗ, досимптоматическое тестирование наследственной предрасположенности к БП, БАл и к РС в настоящее время объективно не оправданно.

6.5. СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ

Введение

Болезни сердца и сосудов — главные причины заболеваемости, инвалидизации и преждевременной смертности в мире. Только в России ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний умирает более 1,2 млн человек [6]. Наиболее распространенные хронические заболевания, предшествующие таким грозным осложнениям, как инсульт и инфаркт миокарда (ИМ), являясь артериальная гипертензия (АГ) и атеросклероз сосудов.

Среди причин сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) можно выделить «внешние» факторы и «внутренние». К экзогенным факторам риска можно отнести курение, злоупотребление алкоголем, ожирение, диабет, гиподинамию, стрессовые ситуации и др. Основные «эндогенные» факторы касаются индивидуальной наследственной предрасположенности к АГ и атеросклерозу сосудов. При этом риск развития таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ИМ, значительно возрастает при неблагоприятном сочетании «внешних» и «внутренних» факторов.

6.5.1. Гены предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям

На данный момент известно более 150 генов, полиморфные варианты которых связывают с предрасположенностью к сердечно-сосудистым заболеваниям [144, 171, 220, 231].

Первые подобные исследования в мире были проведены в начале 90-х годов прошлого века в Санкт-Петербурге под руководством профессора Е. И. Шварца. Было показано, что полиморфизм генов метаболизма липидов и ренин-ангиотензиновой системы ассоциирован с предрасположенностью к АГ, ИБС, ИМ и другим ССЗ [144, 439, 685, 796]. Обстоятельные исследования молекулярных основ ССЗ проводятся в НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН под руководством академика РАМН В. П. Пузырева. Результаты изучения аллельных вариантов генов-кандидатов ССЗ, популяционные и этнические особенности их частот суммированы в монографиях [169, 170].

Выделяют несколько групп генов-кандидатов ССЗ:

- 1) гены, контролирующие метаболизм липидов;
- 2) гены регуляции артериального давления;
- 3) гены свертывания крови и фибринолиза;

- 4) гены молекулярных мессенджеров (сигнальных белков);
- 5) гены пролиферации клеток;
- 6) гены ионных каналов;
- 7) гены метаболизма гомоцистеина;
- 8) гены структурной и функциональной организации миокарда.

В таблице 6.5.1 приведены полиморфные варианты наиболее изученных на сегодня генов, полиморфизм которых может влиять на развитие сердечно-сосудистой патологии.

6.5.2. Артериальная гипертензия

АГ относится к мультифакториальным ССЗ. Диагноз АГ присутствует практически при всех ССЗ. Клинической характеристикой АГ является стойкое повышение артериального давления: систолического > 140 мм рт. ст. и/или диастолического > 90 мм рт. ст., зарегистрированное не менее, чем при двух врачебных осмотрах, при каждом из которых артериальное давление (АД) измерялось, по крайней мере, дважды [176, 177].

АГ, или гипертония, относится к числу главных факторов риска развития ИБС. Наряду с атеросклерозом, она является основной причиной инвалидизации и преждевременной смерти. Согласно многочисленным данным, гипертонией страдает до 20 % взрослого населения высокоразвитых стран. Однако в последнее время большинство ученых склоняются к тому, что значительная часть взрослого контингента больных гипертонической болезнью формируется из детей и подростков с повышенным артериальным давлением, как указано в докладе экспертов ВОЗ № 792 (1992). Распространенность АГ в детском и подростковом возрасте, по данным разных авторов, составляет от 14 до 17 %. В Санкт-Петербурге в 1997 году при обследовании подростков в возрасте 15–17 лет повышенный уровень АД был обнаружен у 33 % детей. Установлено, что у 44 % детей, имеющих АД выше нормы, в последующие годы уровень давления остается стабильно повышенным, а в 12 % случаев отмечают прогрессирование АГ [177]. Повышенное АД чаще регистрируется у мальчиков, чем у девочек (на троих мальчиков приходится одна девочка).

АГ относят к так называемым болезням регуляции, при которых нарушается активность и взаимодействие нейрогуморальных систем регуляции АД, приводящих к структурным изменениям сосудов, особенно клеточных мембран. Это отражается на нарушении трансмембранных потоков ионов натрия, калия и кальция. Кальций активно связывается

Таблица 6.5.1

Гены-кандидаты сердечно-сосудистых заболеваний

Ген	Полиморфизм	Функция белка
I. Метаболизм липидов		
<i>APOA</i> — аполипопротеин А	C+93T	Компонент липопротеиновой плазмы. Участвует в транспорте холестерина в печень
<i>APOCIII</i> — аполипопротеин CIII	C5163G	Компонент липопротеиновой плазмы. Участвует в регуляции катаболизма хиломикрон и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП)
<i>APOB</i> — аполипопротеин В	XbaI	Является структурным белком ЛПНП; обеспечивает узнавание и связывание с рецептором к ЛПНП на поверхности гепатоцитов и других клеток
<i>APOE</i> — аполипопротеин Е	E2/E3/E4	Участвует в доставке холестерина в составе липопротеиновых частиц, в удалении холестерина и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) из мембран клеток и в образовании антиатерогенных ЛПВП
<i>CETP</i> — белок-переносчик холестерина	I495V	Участвует в обратном транспорте холестерина
<i>LDLR</i> — рецептор к ЛПНП	C16730T	Связывает ЛПНП
<i>LIPC</i> — печеночная липаза	C-514T	Дегградация хиломикрон и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в печени
<i>LPL</i> — липопротеинлипаза	S447X	Осуществляет гидролиз триглицеридов в составе хиломикрон
<i>APOA4</i> — аполипопротеин AIV	G360H	Участвует в секреции хиломикрон стенкой тонкого кишечника и в транспорте холестерина
<i>ABCA1</i> — холеcтирол-связывающий белок	V771M, R1587K	Участвует в связывании холестерина
<i>PONI</i> — пароксоназа	G192A, S311C	Гидролизует окисленные липиды до ЛПНП.
II. Регуляция артериального давления		
1. Ренин-ангиотензиновая система		
<i>REN</i> — ренин	I9–83G>A	Катализирует превращение ангиотензиногена в ангиотензин I
<i>AGT</i> — ангиотензиноген	M235T	Является предшественником ангиотензина. Субстрат ренина

Таблица 6.5.1 (продолжение)

Ген	Полиморфизм	Функция белка
<i>ACE</i> — ангиотензин-конвертирующий фермент	I/D	Превращает ангиотензин I в ангиотензин II и инактивирует брадикинин. Является ключевым ферментом ренин-ангиотензиновой системы, регулирует сокращение сосудов, всасывание ионов и воды, синтез альдостерона, катехоламинов, вазопрессина
<i>AGTR1</i> — рецептор 1-го типа к ангиотензину II	1166A>C	Связывает ангиотензин II, опосредует вазоконстрикторную функцию: стимуляция синтеза и секреции альдостерона, канальцевая реабсорбция ионов натрия, снижение почечного кровотока, пролиферация гладкомышечных клеток (ГМК), гипертрофия сердечной мышцы, стимуляция высвобождения вазопрессина и торможение образования ренина
<i>AGTR2</i> — рецептор 2-го типа к ангиотензину II	3123C>A	Связывает ангиотензин II, опосредует вазодилаторную функцию: высвобождение NO и простагличина, антипролиферативное действие
2. Кинин-брадикининовая система		
<i>BKR2</i> — рецептор 2-го типа к брадикинину	-58T>C, I/D	Связывает брадикинин. Результатом активации эндотелиальных β_2 -рецепторов является вазорелаксация, опосредованная эндотелиальной NO-синтазой, и последующая генерация NO. β_2 -рецепторы на ГМК и кардиомиоцитах опосредуют сократительный эффект. Активация β_2 -рецепторов ассоциирована с антипролиферативным эффектом в кардиомиоцитах и фибробластах
3. Адренергическая система		
<i>ADRA1A</i> — адренорецептор A1a	T1441C	Активирует аденилатциклазу через G-белок
<i>ADRA1B</i> — адренорецептор A1b	I/D	Активирует аденилатциклазу через G-белок
<i>ADRA2A</i> — адренорецептор A2a	C780G	Активирует аденилатциклазу через G-белок
<i>ADRB1</i> — адренорецептор B1	S49G	Активирует аденилатциклазу через G-белок
<i>ADRB2</i> — адренорецептор B2	48A>G,81C>G	Активирует аденилатциклазу через G-белок

Таблица 6.5.1 (продолжение)

Ген	Полиморфизм	Функция белка
4. Эндотелиальная система		
<i>EDNRA</i> — рецептор к эндотелину А	T89G	Связывает эндотелин
<i>EDRNB</i> — рецептор к эндотелину В	G40A	Связывает эндотелин
<i>NOS3</i> — эндотелиальная NO-синтаза	4a/b (повтор в 27 п. н.)	Катализирует реакцию образования окиси азота (NO) из L-аргинина. Функция NO состоит в торможении работы сократительного аппарата гладкомышечных элементов стенки сосудов
<i>EDN1</i> — эндотелин 1	L198A	Участвует в вазоконстрикторной функции эндотелия. Стимулирует гипертрофию миокарда и сосудистой стенки
III. Свертывание крови и фибринолиз		
<i>F2</i> — фактор II	G20210A	Участвует в свертывании крови
<i>F5</i> — фактор V	R506Q	Участвует в свертывании крови
<i>F7</i> — фактор VII	R353Q	Участвует в свертывании крови
<i>ITGB3</i> — рецептор тромбоцитарного гликопротеина (GPIIb/IIIb)	A1/A2	Связывает вазопрессорные агенты, стимулирующие активацию тромбоцитов: коллаген, тромбин, тромбоксан A2, аденозинфосфат, норадреналин. Играет важную роль в процессе свертывания крови
<i>FB</i> — фибриноген	—G455A	Участвует в свертывании крови
<i>PAI1</i> — ингибитор активатора плазминогена	4G/5G	Ингибирует активатор плазминогена
<i>PLAT</i> — тканевый активатор плазминогена	I/D	Отвечает за преобразование плазминогена в протеолитически активный плазмин
IV. Молекулярные сигнальные пути		
<i>GNB3</i> — $\beta 3$ -субъединица G-белка	C825T	Участвует в трансмембранных сигнальных путях
V. Пролиферация клеток		
<i>TNFA</i> — фактор некроза опухолей α	—G308A	Участвует в воспалительных реакциях организма

Таблица 6.5.1 (продолжение)

Ген	Полиморфизм	Функция белка
<i>PPARA</i> — рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом α	C484G	Участвует в окислении ферментов липидного метаболизма (регуляция транскрипции генов)
<i>PPARG</i> — рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом γ	P115Q	Вовлечен в дифференцировку адипоцитов
<i>VEGF</i> — эндотелиальный фактор роста	–G634C	Участвует в дифференцировке клеток эндотелия
VI. Ионные каналы		
<i>KCNJ11</i> — калиевый канал подсемейство J тип 11	T649C	Участвует в АТФ-зависимом транспорте ионов калия
VII. Метаболизм гомоцистеина		
<i>MTHFR</i> — метилентетрагидрофолатредуктаза	677C>T	Участвует в обмене гомоцистеина. Катализирует превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилентетрагидрофолат — субстрат для реметилирования гомоцистеина в метионин
<i>MTRR</i> — метионинсинтетазредуктаза	A66G	Участвует в обмене гомоцистеина
<i>CBS</i> — цистатион-бета-синтаза	A114V	Участвует в обмене гомоцистеина и метионина
VIII. Структурная и функциональная организация миокарда		
<i>MYH7</i> — белок тяжелой цепи β -миозина	C7864T	Компонент структурного белка миозина
<i>ADD1</i> — аддуцин	G460T	Белок цитоскелета мембраны, запускает сборку спектрин-актиновой сети, вовлечен в передачу сигнала внутри клетки, взаимодействует со структурными белками цитоплазматической мембраны, которые влияют на транспорт ионов через мембрану
<i>SELP</i> — селектин Р	A76666C (Thr715Pro) V599L, S290N	Играет важную роль в адгезии лейкоцитов
<i>SELE</i> — селектин Е	A561T (Ser128Arg) C1839T (Leu554Phe) G98T	Способствует адгезии лейкоцитов на стадии раннего развития сосудистой атеромы

Таблица 6.5.1 (окончание)

Ген	Полиморфизм	Функция белка
IX. Другие		
<i>INSR</i> — рецептор к инсулину	Gly972Arg	Участвует в транспорте глюкозы и кислорода из крови в ткани, в процессе превращения глюкозы в гликоген
<i>SOD2</i> — супероксиддисмутаза 2	–9TC	Участвует в детоксикации свободных радикалов в митохондриях, играет важную роль в обеспечении резистентности клеток к перекисным соединениям — побочных продуктов окислительного фосфорилирования

саркоплазматическим ретикулумом, накапливается внутри клеток и служит для обеспечения повышенной активности сократительного аппарата мышечных клеток сосудов и сердца, что, в свою очередь, проявляется в утолщении стенок сосудов и гипертрофии левого желудочка [61].

6.5.2.1. Формирование представлений о генетической природе артериальной гипертензии

О роли наследственного фактора в развитии АГ известно уже давно, однако первая обобщенная информация о наследовании АГ в семьях появилась к 20–30-м годам XX века [171]. Было установлено, что причиной АГ являются как средовые, так и наследственные факторы. Причем характер наследования далеко не всегда можно было объяснить менделевскими закономерностями. АГ является мультифакториальным заболеванием, основу которого составляют разные повреждения генома [171]. Однако существует и ряд моногенных форм АГ [200, 568, 643].

Для определения генетического вклада в развитие заболевания был предложен критерий оценки наследственной составляющей заболевания — коэффициент наследуемости, рассчитанный на основании близнецовых исследований. По разным данным, коэффициенты наследуемости для систолического и диастолического АД составляют 0,38–0,46 [6, 171]. Позднее была предложена модель мультифакториального заболевания (МФЗ), в которой выделяют два класса генов — класс главных генов и класс олигогенов/полигенов (ранжированных по вкладу в заболевание и частоте) [144, 171].

Предполагалось, что главные гены можно идентифицировать с помощью сегрегационного анализа, а полигены и олигогены — анализом

неравновесия по сцеплению. Однако такая модель оказалась эффективной только при анализе отдельных форм АГ.

Перспективным методом картирования является метод компьютерной геномики, или биоинформатики, в рамках которой организм рассматривают как взаимодействующие генные сети (см. главу 3).

Генетические детерминанты, определяющие изменение уровня АД, исследуют на различных уровнях биологической интеграции: организменном, органном, клеточном, молекулярном, генетическом и даже эволюционном [171]. Предложенный подход в настоящее время использован при анализе трех генов: аддуцина (*ADD1*), β 3-субъединицы G-белка (*GNB3*) и ангиотензиногена (*AGT*). Связь между полиморфными вариантами гена ангиотензиногена (*AGT*) и АД показана на организменном (есть доказательства взаимосвязи между экспрессией гена и уровнем АД), органном (именно в почках повышенная активность ангиотензиногена усиливает реабсорбцию ионов Na), клеточном (базальный уровень экспрессии данного гена определяется его активностью в клетках печени и в проксимальных канальцах почек), молекулярном (полиморфные варианты промоторной области A(-6) и C67 ассоциированы с увеличением базальной активности белка), генетическом (у близнецов с АГ существует ассоциация полиморфизма T235 (сцеплен с A(-6)) с уровнем АД и количеством белка в плазме крови), эволюционном (гипотеза бережливого, выгодного генотипа — “thrifty genotype”) [169, 171].

В настоящее время основное внимание сосредоточено на изучении генетических детерминант, которые оперируют в физиологических системах, ответственных за поддержание кровяного давления. Прежде всего это относится к ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой системам.

6.5.2.2. Ренин-ангиотензиновая и кинин-брадикининовая системы

Белковые продукты генов ренин-ангиотензиновой системы являются важными регуляторами кровяного давления и гомеостатической функции почки, обеспечивая поддержание жизненно важных процессов в организме. Анатомической основой данной системы является юкстагломерулярный аппарат почки, клетки которого выделяют в кровь фермент ренин [568, 616, 617].

Ренин (продукт гена *REN*), воздействуя на ангиотензиноген (продукт гена *AGT*), превращает его в ангиотензин I (рис. 6.5.1). Этот пеп-

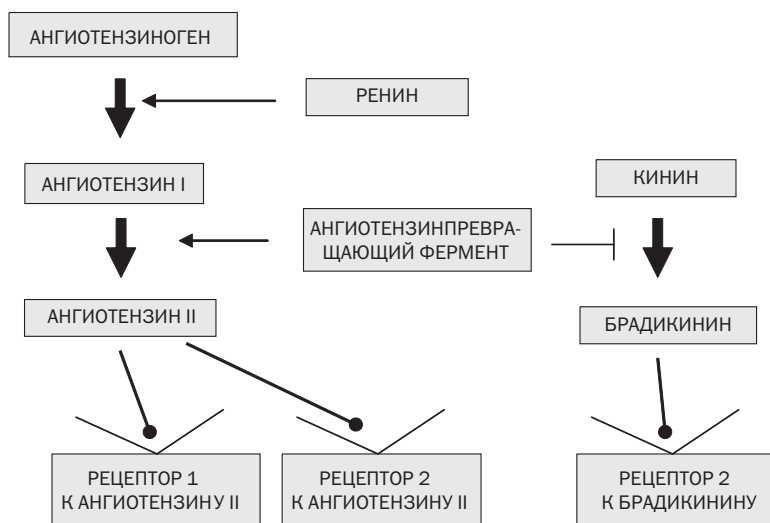


Рис. 6.5.1. Схема взаимодействия продуктов генов ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем

тид, в свою очередь, служит субстратом для ангиотензинпревращающего фермента (продукт гена *ACE*), конвертирующего ангиотензин I в ангиотензин II. Ангиотензин II является биологически активным веществом ренин-ангиотензиновой системы. Этот белок действует через ангиотензиновые рецепторы клеток. Существует два вида рецепторов: AT1 (продукт гена *AGTR1*) и AT2 (продукт гена *AGTR2*). Связываясь с этими рецепторами, ангиотензин II вызывает сужение сосудов и повышает артериальное давление. Считают, что ангиотензин II играет важную роль в патогенезе артериальной гипертензии, увеличивая периферическое сосудистое сопротивление, а также вызывает гипертрофию левого желудочка при гипертензии [616, 617].

Известно, что под действием ангиотензинпревращающего фермента увеличивается выработка одного из гормонов надпочечников — альдостерона, который приводит к усилению реабсорбции натрия в почечных канальцах. Ангиотензинпревращающий фермент также участвует в инактивации брадикинина. Последний является вазодилатирующим фактором и опосредует свое воздействие через брадикининовые рецепторы 2-го типа (продукт гена *BKR2*) [616, 617].

Таким образом, ренин-ангиотензиновая и кинин-брадикининовая системы представляют собой сложную биохимическую цепь, участвующую в регуляции артериального давления (рис. 6.5.1).

6.5.2.3. Гены предрасположенности к артериальной гипертензии

6.5.2.3.1. Ренин

Ген ренина (*REN*) локализован на длинном плече 1-й хромосомы в локусе 1q32, содержит 9 экзонов и имеет размер 12 т. п. о. РНК-транскрипт гена имеет размер около 1,5 т. п. о., его белковый продукт (*REN*) состоит из 406 аминокислот и вырабатывается, главным образом, клетками почек. Ренин катализирует превращение ангиотензиногена в ангиотензин, то есть активирует ренин-ангиотензиновый каскад, участвуя, таким образом, в регуляции кровяного давления [450, 499, 556].

В гене *REN* имеется несколько сайтов полиморфизма: HindIII, BglII, DabI, MboI, HinfI. Однако только для двух из них (BglII, MboI) показана ассоциация с АГ [260, 435, 582, 781]. В арабской популяции [246] при анализе полиморфизма MboI (замена G>A) было показано, что частота генотипа A/A значимо выше в группе больных, имеющих повышенное артериальное давление, чем в группе здорового контроля (34,7 и 14,0% соответственно). В наших исследованиях установлено, что данный полиморфизм оказывает влияние на развитие стабильной формы АГ у детей. У таких больных частота генотипа A/A по гену *REN* составляет 14,0% по сравнению с 3,4% у больных с транзиторной АГ ($p = 0,047$, $\chi^2 = 6,10$ и $p = 0,003$, $\chi^2 = 8,57$ соответственно) [83].

6.5.2.3.2. Ангиотензиноген

Ген ангиотензиногена (*AGT*) локализован на длинном плече 1-й хромосомы (1q42-q43), содержит 5 экзонов и состоит из 12 т. п. о. Белковый продукт гена имеет размеры 53 кДа и включает в себя 452 аминокислоты. Ген *AGT* экспрессируется преимущественно в печени под контролем эстрогенов, глюкокортикоидов, тиреоидных гормонов и ангиотензина II. Кроме того, ангиотензиноген синтезируется в мозге, больших артериях, в почках и в жировой ткани. Ангиотензиноген является субстратом для ренина, который превращает его в ангиотензин I [407].

Существует более тридцати полиморфных вариантов гена *AGT*, из которых наиболее изученными являются M235T и T174M [231]. В случае M235T-полиморфизма (замена треонина на метионин) показана связь T-аллеля и генотипа T/T с повышенным артериальным давлением [269, 270, 641, 684, 711].

Важно отметить, что больные с генотипом T/T по гену *AGT* по сравнению с носителями M-аллеля имеют статистически значимо

более высокие показатели диастолического АД (76,19 мм рт. ст. против 71,47 мм рт. ст., $p = 0,002$) [83]. Известно, что у носителей *T*-аллеля уровень ангиотензина I в крови повышен на 15–20% в сравнении с нормой [461, 684]. Считается, что данный полиморфизм преимущественно влияет на диастолическое, но не на систолическое давление. Во многих, хотя и не во всех, исследованиях показана ассоциация генотипа *T/T* с артериальной гипертензией [684]. Имеются наблюдения, что полиморфизм M235T ассоциирован не только с сердечно-сосудистыми заболеваниями, но и с определенным видом физической работоспособности и даже с долгожительством [11, 461].

6.5.2.3.3. Ангиотензинпревращающий фермент

Ген ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*) локализован на длинном плече 17-й хромосомы в локусе 17q23, содержит 26 экзонов, его размер составляет 45 т. п. о. Мажорный РНК-транскрипт гена *ACE* имеет размер около 5 т. п. о, а его белковый продукт состоит из 1306 а. к. и имеет размер 150 кДа [256]. Ангиотензинпревращающий фермент кодирует два изозима: **соматический** *ACE*, который экспрессируется во многих тканях, включая эндотелий, эпителий почек и других органов, и **тестикулярный** — только в семенниках. *ACE* превращает ангиотензин I в ангиотензин II, а также инактивирует брадикинин.

В настоящий момент известно более двадцати полиморфных вариантов гена *ACE*, однако функционально наиболее значимым считается инсерционно-делеционный (*I/D*) полиморфизм в 16-м интроне, обусловленный наличием или отсутствием *Alu*-повтора. Показано, что уровень *ACE* в сыворотке у здоровых людей, гомозиготных по *D*-аллелю (30% людей имеют генотип *D/D*), в 2 раза выше, чем у гомозигот по *I*-аллелю (23% людей) и имеет среднее значение у гетерозигот (47%). Следовательно, инсерция *Alu*-повтора приводит к пониженной экспрессии гена *ACE*. Однако *I/D* полиморфизм не является функциональным. Показано его тесное сцепление с полиморфизмом 2350G>A в 17-м экзоне, который и влияет на уровень белка *ACE* в плазме крови [305]. Изучению *I/D* полиморфизма гена *ACE* у больных АГ посвящены многочисленные исследования [76, 165, 268, 270, 672, 681, 685, 814]. В большинстве из них достоверных различий в частотах аллелей и генотипов этого полиморфизма у больных АГ по сравнению с таковыми в контроле не обнаружено [672, 685, 814]. Однако в ряде работ было показано, что у мужчин с генотипом *D/D* уровень АД выше, чем у гомозигот *I/I*. У женщин ассоциации

I/D полиморфизма с уровнем АД не выявлено [416, 789]. Интересно, что лица с генотипом *D/D* преобладают среди спортсменов, занимающихся силовыми видами спорта [454, 498, 740].

6.5.2.3.4. Рецептор 1 ангиотензина II

Ген рецептора 1 к ангиотензину II (*AGTR1*) локализован на длинном плече 3-й хромосомы в локусе 3q21–q25, содержит 5 экзонов, его размер составляет 55 т. п. о. Первые четыре экзона кодируют 5'-нетранслируемую последовательность. Кодирующая последовательность в 2 т. п. о. ограничена 5-м экзоном. Размер белкового продукта гена *AGTR1* составляет 41 кДа. Его первичная структура представлена 359 а. к. [329]. Существует два подтипа рецепторов, имеющих 98%-ю гомологию по аминокислотному составу: AT1a и AT1b. AT1a синтезируется во всех тканях, а AT1b — только в плаценте, легких и печени [307]. Основная функция обоих подтипов рецептора — связывание ангиотензина II и передача сигналов вазоконстрикции и пролиферации гладкомышечным клеткам [330].

Существует около двадцати полиморфных вариантов гена *AGTR1* [329]. Наиболее изученный полиморфизм представляет собой замену аденина на цитозин в позиции 1166 (1166A>C) [161, 226, 266, 660]. Показано, что *C*-аллель и генотип *C/C* ассоциированы с повышенным уровнем АД [265]. Однако в последующем было установлено, что данный полиморфизм не является функционально значимым. Как оказалось, он тесно сцеплен с *810T>A* вариантом в промоторной области гена *AGTR1*, влияющим на присоединение транскрипционных факторов [329]. Во многих исследованиях показана ассоциация генотипа *C/C* гена *AGTR1* с предрасположенностью к АГ [396, 454, 660, 681]. Однако не все работы подтверждают такую зависимость [241].

6.5.2.3.5. Рецептор 2 ангиотензина II

Ген рецептора 2 к ангиотензину II (*AGTR2*) локализован на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq22–q23, содержит 3 экзона размером в 3,8 т. п. о. мРНК *AGTR2* кодирует только третий экзон *AGTR2*, транскрипт которого имеет 1 т. п. о. Белковый продукт гена *AGTR2* размером 41 кДа состоит из 363 а. к. [267, 287]. Ген *AGTR2* экспрессируется, главным образом, в сердце, под контролем эстрогенов. Подобно *AGTR1*, *AGTR2* также участвует в ангиотензин II опосредованных реакциях, но, являясь его антагонистом, контролирует преимущественно вазодилататорные функции.

Описано пять полиморфных вариантов гена *AGTR2* [267, 287, 454]. Наиболее изученным является полиморфизм 3123C>A, сцепленный с вариантом +1675G>A в интроне 1, влияющим на начало транскрипции. Показана ассоциация 3123A варианта с АГ у взрослых женщин [454] и у мальчиков, больных гипертонией [83].

6.5.2.3.6. Рецептор 2 к брадикинину

Ген рецептора 2 к брадикинину (*BKR2*) расположен на длинном плече 14-й хромосомы в локусе 14q32.1–q32.2, содержит 3 экзона длиной 39,5 т. п. о. Размер его РНК-транскрипта — около 1,2 т. п. о., белковый продукт состоит из 391 аминокислоты и имеет молекулярный вес 55 кДа. Ген *BKR2* экспрессируется в различных органах и тканях, в том числе и в эндотелии, участвует в вазорелаксации сосудов, стимулируя выработку эндотелиальной NO-синтазы [355, 788].

На сегодня известно два полиморфных варианта в гене *BKR2*: замена в –58 позиции тимина на цитозин (–58T>C) и инсерция/делеция 9 нуклеотидов в 1-м экзоне (I/D полиморфизм). Показано, что у носителей как *T*-, так и *D*-аллелей экспрессия гена выше, чем у носителей *C*- или *I*-аллелей. Активная экспрессия гена *BKR2* ведет к появлению большего числа рецепторов на клетку и ассоциируется с выраженной вазодилатацией. Имеются наблюдения, что аллели *C* и *I* ассоциированы с АГ, а также с повышенной выносливостью у спортсменов [296, 788]. Ассоциация с АГ подтверждена и в наших исследованиях на детях с АГ [83]. При сравнении частот аллелей гена *BKR2* (–58T>C) у мальчиков с АГ и мальчиков контрольной группы были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,03$, $\chi^2 = 4,74$). Частоты аллелей *C* и *T* составили 41,7 и 58,3% — в контроле, 52,7 и 47,3% — для больных АГ соответственно.

6.5.2.4. Комплексный анализ ассоциации полиморфизма с предрасположенностью к артериальной гипертензии

В настоящее время известно, что в большинстве случаев мультифакториальная природа АГ обусловлена генетическим полиморфизмом ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем. Эти заключения основываются на многочисленных исследованиях по изучению ассоциации АГ с полиморфными вариантами соответствующих генов [616, 617]. Обнаружена также связь АГ с некоторыми другими генами, например метилентетрагидрофолатредуктазой, бета-адренорецептором, β_3 -субъединицей G-белка и др. [169, 171, 220, 686, 755].

Однако исследования ренин-ангиотензинового каскада в генезе АГ все еще малочисленны и пока касаются единичных генов, контролирующих отдельные биохимических звенья этого сложного процесса. Естественно, подобный анализ не позволяет судить о молекулярных причинах АГ. Поэтому для анализа сложных признаков многие исследователи используют такие методические подходы, как **мета-анализ, анализ гаплотипов и изучение ген-генных взаимодействий**.

Мета-анализ подразумевает обобщенный количественный анализ данных разных лабораторий по изучению одного и того же полиморфизма при одном и том же заболевании. За счет увеличения размера выборки такой подход обеспечивает большую статистическую мощь, чем каждое отдельное исследование. Он используется для обобщения результатов многих испытаний, зачастую противоречащих друг другу по конечному результату.

Так, в работе Мондри с соавторами [684] проведен анализ ассоциации полиморфизма I/D по гену *ACE* и полиморфизма M235T по гену *AGT* с АГ у белого населения. По обобщенным результатам 25 исследований ими показано, что полиморфизм I/D по гену *ACE* не влияет на предрасположенность к АГ, а для полиморфизма M235T по гену *AGT* выявлена ассоциация M-аллеля (а не T-аллеля, см. п. 6.5.2.3.2) с риском АГ. Показано, что у женщин генотип M/M, а не T/T, является фактором риска АГ. По всей вероятности, подобное противоречие отражает несовершенство мета-анализа, который основан на объединении данных совершенно разных исследований, в которых пациенты различаются по возрасту, полу, клиническим параметрам, этнической принадлежности и многим другим переменным. Например, в работе того же Мондри с соавторами средний возраст больных составлял 59 лет, а здорового контроля — 41 год [684]. Поэтому значение данного метода для объективизации результатов генетического тестирования с целью выяснения генов предрасположенности пока весьма ограничено. В силу этого метод мета-анализа не может быть использован как конечная инстанция для оценки роли полиморфизма в этиологии заболевания. Наглядным примером тому может быть мета-анализ ассоциации полиморфизма 238G>A и 308G>A гена *TNFA* с инфарктом миокарда. Объединение в одну группу данных 10 лабораторий не позволили выявить статистически значимых различий между больными и здоровыми по частотам неблагоприятных аллельных вариантов этого гена с инфарктом миокарда (ИМ). При этом, однако, на основании собственных данных де-

дается предварительный вывод, что полиморфизм 308G>A в промоторной области гена *TNFA*, приводящий к усилению экспрессии и синтеза белка, можно рассматривать как фактор генетического риска развития ИМ. Есть основания считать, что объединение в одно целое сравнительно небольших по численности групп больных с ИМ, ранее генотипированных в разных лабораториях, скорее затрудняет интерпретацию полученных данных, чем способствует их объективизации.

Другим методом изучения ассоциаций является анализ гаплотипов, то есть сочетаний определенных мутаций внутри одного гена на одной хромосоме [270, 306]. К примеру, в работе Тсаи с соавторами проведено исследование ассоциации гаплотипов гена *AGT* с АГ [270]. Были изучены шесть различных мутаций: -217G>A, -152G>A, -20C>A, -6G>A, T174M (3889C>T), M235T (4072T>C) и показана ассоциация с АГ гаплотипа *GGAGCC*, содержащего 235T-аллель, что еще раз подтверждает важную роль этого полиморфизма в генезе АГ.

Наиболее точным и адекватным подходом при анализе ассоциаций является метод изучения ген-генных взаимодействий. Однако в большинстве зарубежных исследований практикуется изучение только дигенных взаимодействий. К примеру, в той же работе показано, что индивиды с *T*-аллелем гена *AGT*, ассоциированным с гипертензией, чаще имеют *I*-аллель, чем *D*-аллель гена *ACE*. В то же время в данной работе взаимодействия аллелей гена *AGT* и аллелей гена *AGTRI*, ассоциированного с АГ, выявлено не было.

Наиболее объективную информацию о генах-кандидатах и генных локусах, ассоциированных с АГ, можно получить с помощью нового прогрессивного метода — общегеномного скрининга ассоциаций (см. главу 4).

Следует отметить, что при изучении полиморфизма генетической сети важно не только максимально изучить взаимодействия генов, но и грамотно сформировать группы пациентов и контроля. Известно, что генетические факторы мультифакториальных заболеваний сильнее проявляются в детском возрасте, когда воздействие окружающей среды еще не велико. В настоящее время существует всего одна работа, в которой анализировали полиморфизм нескольких генов ренин-ангиотензиновой системы (I/D гена *ACE*, M235T гена *AGT*, 1166A>C гена *AGTRI*) у больных гипертензией в детском возрасте [710]. Авторами было показано, что из всех проанализированных генов данной системы только генотип *M/T* по гену *AGT* ассоциирован с гипертензией.

Таблица 6.5.2

Сравнительный анализ результатов генетического тестирования у детей, больных артериальной гипертензией, методом «сумма баллов генотипов» [66]

Метаболические системы	Группа	Средняя сумма баллов в группе 1	Средняя сумма баллов в группе 2	Достоверность (Р)
Ренин-ангиотензиновая система	общая	3,56	4,42	*0,02
	мальчики	3,71	4,24	0,24
	девочки	3,18	4,79	*0,01
Ренин-ангиотензиновая и кинин-брадикининовая системы	общая	5,71	6,74	*0,03
	мальчики	6,03	6,59	0,43
	девочки	4,94	7,07	*0,003
* — статистически значимые результаты				

Для более объективной оценки вклада нескольких полиморфных генов в патологический процесс мы предложили использовать систему баллов. С этой целью гомозиготам по аллелю, не связанному с повышением АД, присваивали 0 баллов, гетерозиготам — 1 балл, гомозиготам по аллелям, связанным с повышением АД — 2. Затем для каждого пациента суммировали баллы всех исследованных генотипов. После этого, в каждой группе пациентов определяли среднюю величину баллов [97]. Результаты исследования приведены в таблице 6.5.2.

При сравнении средних сумм баллов, полученных при оценке полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы в группе детей со стабильной формой АГ (группа 2) и без таковой (группа 1) получены статистически значимые отличия ($p = 0,02$). Так, средняя сумма баллов у больных со стабильной АГ составила 4,42 (группа 2) и была несколько выше, чем у больных транзиторной АГ (группа 1), — 3,56. Статистически значимые отличия были особенно выражены в случае, когда сравнивали результаты обследования девочек групп 1 и 2 ($p < 0,01$), тогда как при обследовании мальчиков обеих групп отличий не наблюдалось ($p = 0,24$). Так, средняя сумма баллов у пациентов группы 1 составила 3,18 для девочек и 3,71 — для мальчиков. В группе 2 соответствующие показатели составляли 4,79 для девочек и 4,24 — для мальчиков (табл. 6.5.2). Сходные результаты получены и при оценке суммы баллов при расчетах, в которых учитывали и гены кинин-брадикининовой системы.

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о достоверной ассоциации полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы и генов

кинин-брадикининовой системы с развитием АГ. Следовательно, наряду с другими клиническими и лабораторными методами тестирования генов этих систем можно рассматривать как один из реальных путей для выявления лиц с повышенным наследственным риском АГ и, соответственно, предрасположенных к заболеваниям сердечно-сосудистой системы.

Заключение

В данной главе приведены собственные и литературные данные, касающиеся, главным образом, генетических причин АГ (полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы) как одного из решающих факторов ССЗ. Для большинства генов данного метаболического каскада (*REN*, *AGT*, *AGTR2*, *BKR2*) такая ассоциация действительно показана в исследованиях, по крайней мере, нескольких разных лабораторий и на разных группах больных. Для некоторых генов (*ACE*, *AGTR1*) такая ассоциация представляется сомнительной, а результаты разных лабораторий противоречивы. В какой мере противоречивость результатов отражает уникальные популяционные и этнические особенности, в какой они зависят от качества и однородности подбора групп пациентов с АГ, остается неизвестным и требует дальнейшего изучения. Важным подходом к пониманию молекулярных основ ССЗ является широкомасштабный скрининг генов-кандидатов и оценка их вклада в развитие АГ. Особенно интересными представляются результаты комплексного анализа ассоциации полиморфизма сразу нескольких генов ренин-ангиотензинового каскада с предрасположенностью к АГ, с использованием таких современных технологий, как биочипы (см. главу 8). Метод подсчета баллов, на наш взгляд, вполне приемлем при анализе ген-генных взаимодействий внутри одной генной сети (метаболического процесса). Он позволяет учесть синергизм действия генов каскада и установить ассоциацию сочетания их аллельных вариантов с АГ — наиболее значимой кардиологической патологией.

6.6. ГЕНОМИКА АКУШЕРСКОЙ ПАТОЛОГИИ

6.6.1. Эндометриоз

Введение

Эндометриоз (Э) — одно из наиболее частых доброкачественных гинекологических заболеваний. В настоящее время Э рассматривают

не только как специфическое местное заболевание, но как патологический процесс (**эндометриоидная болезнь**), в который вовлечены как смежные, так и отдаленные органы и целые системы организма.

Согласно современным представлениям, Э — это дисгормональное, иммунозависимое и генетически обусловленное заболевание, характеризующееся доброкачественным разрастанием ткани, сходной по морфологическому строению и функции с эндометрием, но находящейся за пределами полости матки [45]. В зависимости от локализации процесса Э может быть **генитальный** (внутренний и наружный) и **экстрагенитальный**. Внутренний Э характеризуется патологическим процессом, развивающимся в миометрии (внутренний эндометриоз тела матки — аденомиоз) и в маточных трубах (эндометриоидное поражение). К наружному Э относятся эндометриоидные поражения брюшины, крестцово-маточной связки, яичников, шейки матки, париетальной брюшины, влагалища. По степени распространенности патологического процесса наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) подразделяется на малые формы, формы средней тяжести и тяжелые [237].

Частота Э, по разным данным, варьирует от 7 до 65 %. Большинство больных Э страдают от выраженного синдрома тазовых болей, 50–80 % пациенток бесплодны, у многих женщин имеются нарушения эндокринного и иммунного статусов.

Недостаточное понимание основных механизмов патогенеза Э объясняет отсутствие эффективных способов его лечения. Хирургические методы зачастую не способствуют восстановлению специфических функций женского организма и не исключают рецидивов заболевания. Более чем 25-летний опыт гормональной терапии, направленной на подавление активности эндометриоидных очагов, также не позволяет добиться полного выздоровления. Частые рецидивы и резистентность к гормональной терапии многих клинических форм Э, наряду с ее серьезными побочными эффектами, существенно затрудняют консервативное лечение.

Большое значение в патогенезе Э придают генетическому фактору. Известно, что риск заболевания у женщин 1-й степени родства с больными Э в 7–10 раз выше, чем в семьях без этой патологии [45].

6.6.1.1. Патогенез

Несмотря на многолетние клинические и экспериментальные исследования, достоверные сведения о механизмах возникновения Э практически отсутствуют [544]. Существуют две основные теории патогенеза

Э. Согласно первой из них, эндометриоидная ткань развивается из клеток целомического эпителия брюшины, которые в норме, еще во внутриутробном периоде, дают начало Мюллеровым протокам — предшественникам маточных труб. В соответствии со второй — эндометриоидная ткань представлена клетками эндометрия, попавшими в брюшную полость в результате ретроградной менструации (заброс крови в брюшную полость через маточные трубы). Эта теория, получившая название трансплантационной, в настоящее время считается общепризнанной.

Следует отметить, что, по некоторым оценкам, ретроградный заброс менструальной крови отмечается почти у 90% женщин. Однако остается непонятным, почему только у некоторых из них он приобретает агрессивный характер, то есть завершается имплантацией и прорастанием клеток эндометрия в подлежащие ткани. Неясно также, почему у части женщин процесс носит прогрессивный характер и быстро переходит в эндометриоидную болезнь, тогда как у других он имеет вялое хроническое течение.

Большинство исследователей считает, что возможность имплантации эндометриоидных клеток и их пролиферация происходят лишь в том случае, если имеются нарушения в иммунной системе (иммунодепрессия). Поскольку активность многокомпонентной иммунной системы зависит от баланса половых и гонадотропных гормонов, эндокринные нарушения при Э приводят к дисфункции этой системы, что и способствует приживлению клеток эндометрия за пределами полости матки и формированию эндометриоидных очагов. Патогенетические механизмы, лежащие в основе имплантации клеток эндометрия, их метаплазии и формирования эндометриоидного очага представлены на рисунке 6.6.1.

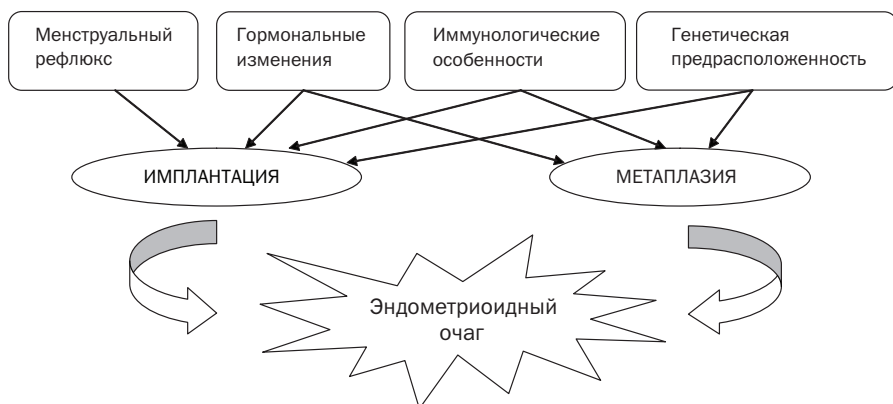


Рис. 6.6.1. Взаимодействие основных патогенетических факторов при эндометриозе



Рис. 6.6.2. Эндогенные и экзогенные факторы оксидативного стресса, способствующие развитию эндометриоза [182]

Активное вмешательство человека в природу, постоянно меняющаяся среда его обитания, прогрессивное нарастание уровня загрязнения окружающей среды, техногенные катастрофы привели к быстрому увеличению числа **экогенетических болезней** [56–58], ведущее место среди которых принадлежит болезням иммунной системы (иммунодефициты, аллергии, аутоиммунные заболевания и др.) [130]. Увеличение частоты Э в промышленно загрязненных районах позволяет отнести эту патологию к экогенетическим болезням [3].

Исследования последних лет показали, что свободные радикалы, в том числе оксид азота (NO) и активные формы кислорода (АФК), образующиеся в процессе клеточного дыхания, могут играть большую роль в возникновении различных патологических состояний, в том числе и в возникновении Э [213, 734]. АФК и реакционноспособные свободные радикалы оказывают выраженный цитотоксический эффект, мутагенное или канцерогенное действие, нарушая перекисное окисление липидов клеточных мембран, повреждая ДНК и белки клетки [119]. АФК также продуцируются в процессе метаболизма эстрадиола и детоксикации многих ксенобиотиков (рис. 6.6.2). Известно, что необ-

ходимым условием функционирования здоровых клеток, в том числе клеток эндометрия, является поддержание на определенном уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ), регуляция которого осуществляется многокомпонентной антиоксидантной системой.

Неблагоприятная экологическая обстановка, в том числе загрязнение окружающей среды вредными промышленными соединениями и сельскохозяйственными ядами, вносит свой вклад в возникновение Э. На это, в частности, указывает более высокая, по сравнению с развивающимися странами, частота Э в таких промышленно развитых странах, как США, Бельгия, Италия, Израиль [432, 713]. Убедительные данные о роли загрязнения внешней среды в этиологии Э получены в экспериментальных исследованиях по изучению влияния галогенизированных ароматических углеводородов (частых и устойчивых загрязнений окружающей среды).

С помощью одного из них — диоксина (1,2,3,7,8-тетрахлородибензо-3-диоксина), который входит в состав многих пестицидов и сельскохозяйственных ядов, в хронических опытах на обезьянах удалось получить типичный Э.

6.6.1.2. Генная сеть

Как уже упоминалось, Э является типичным мультифакториальным заболеванием. Учитывая сложность его патогенеза, предполагают, что число генов-кандидатов заболевания достаточно велико, а генная сеть сложна и весьма разнообразна [5]. Она включает в себя различные функционально тесно взаимосвязанные гены метаболизма (детоксикации), гены, ответственные за иммунный статус, эндокринные функции, гены межклеточных взаимодействий, проонкогены (рис. 6.6.3).

Рассмотрим наиболее значимые гены-кандидаты Э, частоты аллельных вариантов и генотипы которых были проанализированы на основании литературных и собственных данных. Список таких генов приведен в таблице 6.6.1.

Приведенные в последующих разделах главы собственные результаты генетического тестирования особенностей аллельного полиморфизма генов-кандидатов получены на образцах ДНК 122 больных Э, 54 больных аденомиозом, проходивших лечение в НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН, и 90 женщин репродуктивного возраста (18–45 лет) без клинических признаков Э, составивших контрольную группу. Обобщенные результаты распределения функционально ослабленных генотипов по 8 различным генам у больных Э и в контроле представлены на рисунке 6.6.4.

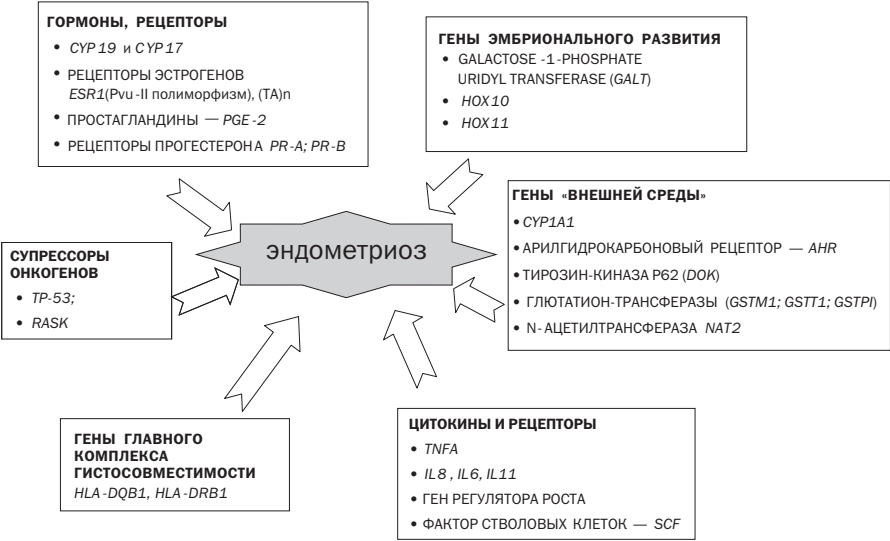


Рис. 6.6.3. Эндогенные и экзогенные факторы оксидативного стресса, способствующие развитию эндометриоза [160]

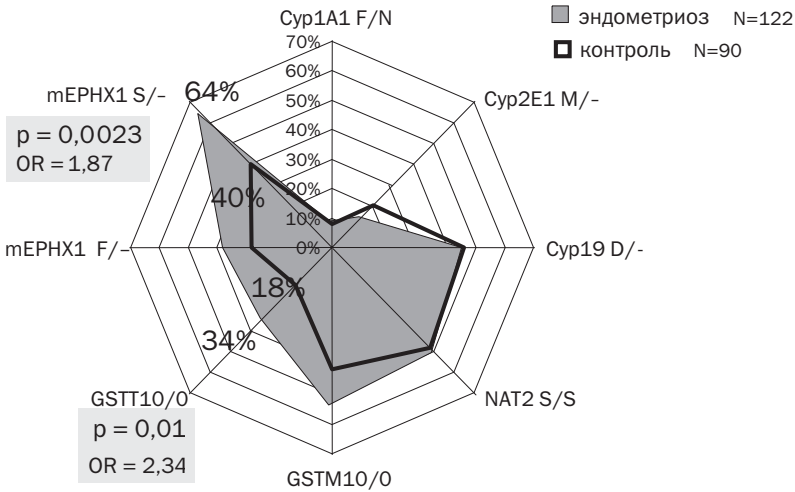


Рис. 6.6.4. Частоты функционально ослабленных генотипов у больных с эндометриозом и в контроле

Таблица 6.6.1

Гены-кандидаты эндометриоза

ГЕН	Полиморфизм
Гены метаболизма (системы детоксикации ксенобиотиков)	
<i>CYP1A1</i> *	Экзон 7, Hinc II полиморфизм (A2455G (Ile462Val)), F(462Val) — «быстрый» аллель
<i>CYP2E1</i> *	Интрон 7, Tag I полиморфизм (C9896G)
<i>CYP17A1</i>	5'-нетранслируемая область, полиморфизм T27C
<i>CYP19A1</i> *	(TTTA) _n повтор в интроне 4, del(TCT)
<i>EPHX1</i> *	Экзон 3, T337C (Tyr113His), S (113His) — «медленный» аллель Экзон 4, A415G (His139Arg), F (139Arg) — «быстрый» аллель
<i>GSTM1</i> *	Del/del (0/0)
<i>GSTT1</i> *	Del/del (0/0)
<i>NAT2</i> *	F — «быстрый» (немутантный) аллель S1(C481T), S2(G590A), S3(G857A) — «медленные» аллели
Гены иммунной системы	
<i>IL4</i> *	Аллель C — (промоторная область, полиморфизм T590C)
<i>IL4R</i> *	Аллель G — (A1902G, полиморфизм — Gln551Arg)
<i>IL6</i>	Промоторная область, полиморфизм C634G, G174C
<i>TGFB1</i>	Аллель T — (полиморфизм C509T)
<i>TNFA</i>	Промоторная область, варианты полиморфизма — G238A, G308A, C857T, C863A, T1031C
Гены эндокринных функций	
<i>ERα</i>	Pvu-II полиморфизм, (TA) _n
<i>ERβ</i>	Alu I полиморфизм
<i>PR</i>	Интрон G, 306 п. о. инсерционный полиморфизм
Другие возможные гены-кандидаты эндометриоза	
<i>TP 53</i> *	Интрон 3, ins/del полиморфизм, кодон 72, полиморфизм Arg72Pro
<i>GALT</i>	Локус короткого плеча 9-й хромосомы, полиморфизм N314D
* — гены, тестируемые в Лаборатории пренатальной диагностики НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН	

6.6.1.2.1. Гены эндокринных функций

Важное место в патогенезе Э принадлежит изменениям в нейро-эндокринном звене репродуктивной системы «гипоталамус–гипофиз–яичники». Наружный генитальный Э редко встречается до менархе и после менопаузы, не наблюдается у женщин с аменореей. Заболевание

стабилизируется или регрессирует во время физиологической беременности и искусственно вызванной гормональной аменореи.

Гипотеза о влиянии эстрогенов и прогестерона на рост перитонеальных эндометриоидных имплантантов проверялась в экспериментах на кастрированных обезьянах [392]. Показано, что эстрогены и прогестерон (стероидные гормоны) поддерживают рост эндометриоидной ткани на брюшине. При гипоэстрогении и гипопрогестеронемии островки эктопической эндометриоидной ткани атрофируются. Именно эти гормональные ответы эндометриоидной ткани формируют физиологическую основу для медикаментозной (гормональной) терапии.

Местом действия гормонов являются ядра клеток-мишеней. В крови стероидные гормоны обычно связаны с транспортными белками. Однако через цитоплазматическую мембрану проникает лишь свободный гормон. В цитоплазме или в клеточном ядре гормон взаимодействует со специфическим рецептором. Рецепторы гормонов характеризуются высоким уровнем сродства к гормону и высокой избирательностью. Связывание гормона влечет за собой конформационную перестройку молекулы рецепторного белка, сопряженного с другими белками, диссоциацию с освобождением от белков-ингибиторов и образование димеров, обладающих повышенным сродством к ДНК. Ключевой стадией процесса гормональной регуляции является связывание димеров гормон-рецепторного комплекса с двунитевой ДНК [119].

Существует предположение, что у больных Э нарушен механизм цитоплазматического связывания стероидных гормонов, приводящий к изменению их биологического действия [4]. По данным некоторых исследователей, число рецепторов эстрадиола и прогестерона в клетках эндометриоидных очагов меньше, чем во внутриматочном эндометрии. По числу рецепторов андрогенных стероидов эндометриоидные очаги существенно не отличаются от внутриматочного эндометрия [251]. Выявлены также некоторые особенности динамики содержания рецепторов в эндометриоидных очагах, зависящие от их локализации [4]. По мере удаления пораженного органа от матки (внутри малого таза) среднее число стероидных рецепторов в эндометриоидных гетеротопиях снижается [201]. Интересно, что у больных с «классической» тяжелой формой Э уровень прогестерон-связывающих рецепторов в очагах Э почти в 9 раз ниже, чем в норме.

Изучение гормональных механизмов развития эндометриоза позволило установить ассоциацию некоторых полиморфных вариантов генов

эстрогеновых рецепторов α и β (ER α , ER β), а также гена рецептора прогестерона (PR) с развитием Э в различных популяциях. Анализ Pvu II и (TA) $_n$ полиморфизма гена эстрогенового рецептора альфа (ER α) выявил статистически значимые различия частот генотипа Pvu II/Pvu II у больных Э в Греции и Италии в сравнении с таковой в контрольной группе [292, 410]. В то же время в японской популяции подобной ассоциации не было выявлено, однако была обнаружена позитивная связь между *Alu-I* полиморфизмом гена эстрогенового рецептора β (ER β) и тяжелой формой (IV стадией) Э [678]. Анализ полиморфизма в интроне G рецептора прогестерона (PR) выявил корреляцию между наличием 306-нуклеотидной инсерции и увеличением риска развития заболевания у жительниц Италии и Австрии более чем в 2 раза [458, 696].

Ключевым ферментом биосинтеза эстрогенов является цитохром-P450-ароматаза 19 (CYP19). Ген ароматазы экспрессируется в яичниках, плаценте, мозге, костях, в жировой и некоторых других тканях [586]. Ароматаза отсутствует в нормальном эндометрии, но в эндометриоидных гетеротопиях отмечен ее повышенный уровень [586]. Присутствие ароматазы в эндометриоидных клетках обеспечивает превращение стероида C19 в эстроген E2, который активирует фермент циклооксигеназу 2, превращающий арахидоновую кислоту в простагландин PGE2. Последний, в свою очередь, активирует экспрессию ароматазы, и цикл замыкается. В нормальном эндометрии эстроген E2 превращается в эстрон E1 с помощью фермента 17-бета-гидрооксистероиддегидрогеназы тип 2, который отсутствует в эндометриоидных гетеротопиях. Увеличение концентрации эстрогена E2 стимулирует рост эндометриоидных очагов [276, 393, 586]. Показано, что изменения содержания ароматазы в стромальных клетках при Э вызывают превращение андростендиона в эстрон, который легко преобразуется в активный эстроген — 17- β -эстрадиол [586].

Выявлена ассоциация полиморфного микросателлита (TTTA) $_n$ в интроне 4 (аллели A6 и A7) гена *CYP19A1* и делеции трех нуклеотидов (TCT) с развитием таких эстрогензависимых гинекологических заболеваний, как Э, аденомиоз, лейомиомы и эндометриальная аденокарцинома [301, 377].

Как показали многочисленные исследования, повышенная экспрессия гена *CYP19A1* играет ключевую роль в возникновении Э [397, 587, 813, 815]. Предполагают, что полиморфизм (TTTA) $_n$ влияет на сплайсинг первичного транскрипта гена *CYP19A1*, в результате чего появляется изоформа фермента с повышенной активностью. Выявлены

Таблица 6.6.2

Распределение частот генотипов *CYP19A1* (del(TCT)) у больных аденомиозом и в контроле

Генотипы	Контроль		Аденомиоз	
	n	%	n	%
<i>D/D</i>	6	8,3	10	18,5
<i>D/I</i>	21	29,2	23	42,6
<i>I/I</i>	45	62,5	21	38,9
Всего	72	100	54	100

популяционные различия при изучении ассоциации полиморфизма этого гена с развитием заболевания. Так, для больных Э в японской популяции характерен полиморфный маркер — делеция 3 нуклеотидов в 4 интроне [301], а для больных греческой — аллель (*TTTA*)₁₀ [378]. При исследовании микросателлита (*TTTA*)_n в 4 интроне гена *CYP19A1* и делеции трех нуклеотидов (TCT) у больных наружным генитальным Э в Северо-Западном регионе России не было обнаружено достоверных различий в распределении частот аллелей и генотипов этих полиморфных вариантов гена *CYP19A1* [5].

В то же время сравнительный анализ частот генотипов по полиморфизму del(TCT) гена *CYP19A1* у пациенток с аденомиозом и в контрольной группе выявил статистически значимые различия ($p < 0,05$, df2). Частоты генотипов *D/D*, *D/I* у больных аденомиозом оказались существенно выше, чем в контроле (18,5, 42,6% и 8,3, 29,2% соответственно). Частота аллеля *D* среди больных составила 61,1%, что достоверно выше, чем в контрольной группе (37,5%) ($p < 0,01$, df1) (табл. 6.6.2).

Согласно коэффициенту соотношения шансов, риск развития аденомиоза повышается в 2,5 раза при наличии del(TCT) в гене *CYP19A1* (OR = 2,63; CI:1,28–5,37). Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов по гену *CYP19A1* ((*TTTA*)_n полиморфизм) не выявил статистически значимых различий между выборками больных с аденомиозом, с эндометриоидными кистами и контролем [85].

Рецепторы стероидов обнаружены не только в железистых клетках эндометрия и эндометриоидных очагов, но и в клетках стромы (макрофаги, лимфоциты) [586]. Количество рецепторов, в том числе и в клетках стромы, колеблется в зависимости от фаз менструального цикла, и, следовательно, половые гормоны могут непосредственно влиять на им-

мунокомпетентные клетки. Нарушение регуляции половых гормонов, предшествующее развитию Э, может влиять на уровень активности иммунокомпетентных клеток стромы, а через них и на состояние иммунологического статуса в целом.

Не исключено, что длительное напряжение защитно-адаптационных реакций организма, сопровождающееся увеличением секреции глюкокортикоидных, гонадотропных и половых гормонов, приводит к дисфункции иммунной системы, способствует приживлению элементов эндометрия за пределами полости матки и формированию очагов Э.

6.6.1.2.2. Гены иммунной системы

Исследованию роли иммунной системы в развитии Э уделяется большое внимание. Имплантация эндометриоидных клеток и их пролиферация происходят лишь в том случае, если у женщины имеются нарушения клеточного и гуморального иммунитета [45]. Проведенные исследования позволили установить, что Э развивается на фоне дисфункции иммунной системы, выражающейся в наличии Т-клеточного иммунодефицита, угнетении функций Т-супрессоров, активизации гиперчувствительности замедленного типа [197, 203, 375]. По сравнению с нормой у больных Э активность Т-лимфоцитов снижена почти в 2 раза. Степень Т-иммунодефицита коррелирует с тяжестью и распространенностью процесса, а также зависит от клинико-анатомических вариантов заболевания и локализации эндометриоидной ткани [2, 125]. Одновременно на 60% возрастает число В-лимфоцитов, но содержание В-клеток резко снижается [321]. У пациенток с Э отмечаются дефекты естественной киллерной активности лейкоцитов, теряющих способность распознавать и лизировать эндометриальные клетки [703]. Кроме того, у больных Э по сравнению со здоровыми женщинами отмечается снижение содержания дифференцированных естественных киллерных клеток (НК-клеток) периферической крови. Показано также, что Э сопровождается снижением цитотоксической активности НК-клеток в перитонеальной жидкости и периферической крови, причем степень такого снижения коррелирует с тяжестью заболевания [2, 125, 511, 639]. Отмечено появление специфических антител к эндометриоидной ткани в перитонеальной жидкости и повышение активности Т-лимфоцитов в реакции с митогенами. Все это свидетельствует об активации аутоиммунных процессов при Э [45].

Большое внимание в патогенезе Э уделяется цитокинам, которые являются посредниками межклеточных взаимодействий, регулируют

кроветворение, иммунный ответ, клеточный цикл, участвуют во многих физиологических и патологических процессах. Цитокины включают гемопоэтические факторы роста, интерфероны, лимфокины, хемокины. Гены, кодирующие провоспалительные цитокины, характеризуются значительным полиморфизмом, вследствие чего синтезируются белки с разной функциональной активностью. Известно, что типичные эндометриоидные клетки характеризуются повышенной активностью цитокинов, которые стимулируют пролиферативные процессы в эндометриоидных очагах. Существуют данные о повышении в перитонеальной жидкости больных Э уровня фактора некроза опухолей TNF, колонии стимулирующего фактора (CSF), интерлейкина-1, интерлейкинов-6, -8 и -11 [166, 195, 202, 717].

Среди генов, контролирующих синтез этих иммунологических факторов, наиболее убедительная информация об их связи с Э получена в отношении генов **интерлейкина-8 (*IL8*)**, **интерлейкина-6 (*IL6*)**, **фактора некроза опухолей (*TNFA*)** и **гена трансформирующего ростового фактора (*TGFB*)**.

В частности, выявлена ассоциация полиморфизма –509 С/Т гена *TGFB1* с развитием Э [409]. При анализе трех полиморфных вариантов промоторной области гена *TNFA* установлена ассоциация определенных гаплотипов с повышением риска возникновения Э [445].

Являясь регуляторными факторами, **цитокины** играют важную роль в развитии иммунного ответа как клеточного, так и гуморального типов. Один из них, ген интерлейкина-4 (*IL4*), кодирует цитокин из группы гемопоэтинов, который играет важную роль в иммунологических механизмах аллергии и воспаления. Белковый продукт синтезируется Т-клетками, играет важную роль в продукции иммуноглобулина Е, а также является фактором роста В-клеток. По результатам проведенного анализа полиморфизма гена в промоторной области (Т590С) у японских семей с атопическим дерматитом, было высказано предположение, что С-аллель ассоциирован с повышенной транскрипционной активностью гена интерлейкина-4 [570]. Однако анализ ассоциации данного полиморфизма с возникновением Э, проведенный в Японии, на Тайване и в Северо-Западном регионе России, не обнаружил различий в частотах аллеля С у больных Э и в контроле [160, 399, 673].

Ген рецептора интерлейкина-4 (*IL4R*) рассматривается как один из основных регуляторов синтеза иммуноглобулина Е. Аллельные варианты *IL4R* коррелируют с усилением или с ослаблением сигнала интерлейкина-4 [742]. Полиморфизм А1902G в гене *IL4R* приводит к замене глицина

Таблица 6.6.3

Частоты генотипов по гену *ILR4* в группе больных с эндометриозом и контрольной группе (генотипы: *Arg/Arg*; *Arg/Gln*; *Gln/Gln*)

Группы и количество индивидов (n)	Частоты генотипов по гену <i>ILR4</i>		χ^2	p
	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln+Gln/Gln</i>		
Больные эндометриозом (36)	16,7	83,3	10,14	0,001
Контрольная группа (69)	1,4	98,6		

на аргинин в 551 позиции белка (Gln551Arg). Сравнительный анализ частот генотипов по этому полиморфизму выявил статистически значимое увеличение частоты генотипа *Arg/Arg* у больных Э по сравнению с контрольной группой в Северо-Западном регионе России ($p < 0,05$) [160] (табл. 6.6.3).

Согласно коэффициенту соотношения шансов, генотип *Arg/Arg* по гену *ILR4* в 13,5 раза повышает риск развития Э (OR = 13,60; CI: 2,43–76,26).

6.6.1.2.3. Гены метаболизма (системы детоксикации ксенобиотиков)

Многочисленные эпидемиологические исследования указывают на то, что практически все широко распространенные заболевания, включая почти 90 % всех онкологических заболеваний, в той или иной степени связаны с действием неблагоприятных внешних факторов. Различные химические токсины (циклические ароматические углеводороды, нитрозосоединения, ароматические амины), воздействуя на организм, могут провоцировать начало этих заболеваний [128]. В зависимости от особенностей генома различные индивиды могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам [621]. Гены, кодирующие ферменты системы детоксикации (гены метаболизма), характеризуются генетическим полиморфизмом и обнаруживают существенные популяционные, этнические и расовые вариации, связанные с исторически сложившимися традициями, различиями продуктов питания, географической средой обитания, эпидемиями инфекционных заболеваний и пр.

Большинство ксенобиотиков, попадая в организм, не оказывают прямого биологического эффекта, а вначале подвергаются различным превращениям, так называемой биотрансформации, которая завершается их выведением из организма. Как правило, она представляет собой многоступенчатый, «каскадный» процесс, в котором одновременно или

поочередно участвуют многие ферменты системы детоксикации. В наиболее типичном варианте биотрансформация ксенобиотиков представлена трехэтапным процессом, включающим в себя активацию (фаза 1), детоксикацию (фаза 2) и выведение (фаза 3). Гены системы детоксикации, аллельные варианты которых были протестированы в наших исследованиях у больных Э, приведены в таблице 6.6.1.

6.6.1.2.3.1. Гены 1-й фазы детоксикации

В результате действия ферментов 1-й фазы происходит активация ксенобиотиков с образованием промежуточных электрофильных метаболитов (свободные радикалы, перекиси, активные кислород и азот). Фаза 1 (активации) обеспечивается, главным образом, суперсемейством цитохрома P-450 (CYP), а также многочисленным семейством нецитохромных окислителей (гидролазы, эстеразы, амидазы, алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и др.). Их основные функции заключаются в присоединении к молекуле ксенобиотика гидрофильных групп, благодаря чему происходит детоксикация десятков тысяч веществ. Однако в большинстве случаев ферменты фазы 1 осуществляют в клетке метаболическую активацию ксенобиотиков, что сопряжено со значительной опасностью для клетки. Изоферменты семейства CYP I участвуют в метаболизме некоторых лекарственных средств (ЛС) и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) — основных компонентов табачного дыма и продуктов сжигания органического топлива [126]. Способность изоферментов CYP I к индукции под действием ПАУ, в том числе диоксина и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксина (TCDD), стимулировала изучение этих цитохромов у больных с Э.

CYP1A1 кодирует фермент арилуглеводородкарбоксилазу, который участвует в метаболизме эстрогенов, осуществляя активацию эстрадиола [581]. Исследования, посвященные роли различных полиморфных вариантов гена *CYP1A1* в развитии Э, немногочисленны. В частности, проводился анализ MspI-полиморфизма интрона 7 (T6235C и A4889G), а также однонуклеотидных замен в экзоне 7 (A2455G(Ile462Val)) и в промоторной части гена (G-469A и C-459T) [479]. Полученные результаты позволили говорить о связи полиморфизма с Э. Однако наследственный риск развития заболевания в разных популяционных группах сильно различался [378, 478, 586, 645]. В британской и греческой популяциях подтвердилась ассоциация MspI-полиморфизма *CYP1A1* с развитием Э, в то время как для больных Э из Южной Индии подобной зависимости не выявлено.

Интересно, что частоты некоторых полиморфных вариантов гена *CYP1A1* в контрольных популяционных выборках также существенно варьируют. Так, например, для *MspI*-полиморфизма частота гомозигот и гетерозигот дикого генотипа в Британии составила 24,5 % и была вдвое меньше, чем в Китае, — 57,5 % [480]. Известно, что однонуклеотидная замена в 7 экзоне (A2455G (Ile462Val)) приводит к появлению «быстрой» формы фермента [30]. Частота генотипов и аллелей полиморфизма A2455G (Ile462Val) гена *CYP1A1* между выборками больных Э и контролем Северо-Западного региона России статистически значимых различий не показала. Вместе с тем частота «быстрого» аллеля *F* (2455G) гена *CYP1A1* в подгруппе больных с тяжелой формой Э из Северо-Западного региона России превысила таковую у пациентов с легкой формой более чем в 2 раза [12]. Вероятно, данный полиморфный вариант ассоциирован с «быстрой» формой фермента (аллель *F* (2455G)), который способствует увеличению содержания промежуточных токсических продуктов в эндометрии. Последние запускают цепь биохимических реакций, модулирующих гормональную активность, что способствует имплантации и разрастанию эндометрия.

mEPHX1 — митохондриальная эпоксидгидролаза (мЭГ) — относится к семейству эпоксидгидролаз (ЭГ), которые контролируют первый, промежуточный этап детоксикации, присоединяя воду к эпоксидам, превращая их в трансгидродиолы и далее в конъюгаты с глюконовой кислотой и глютатионом [18, 126].

Различный уровень ферментативной активности митохондриальной ЭГ обусловлен однонуклеотидными заменами в 3 и в 4 экзоне гена *EPHX1*: мутация T337C (Tyr113His) — «медленный» аллель *S*, мутация A415G (His139Arg) — «быстрый» аллель *F*. Имеются данные, что эти полиморфные варианты не влияют на экспрессию и трансляцию гена *EPHX1*, но могут изменять посттрансляционную стабильность белка [564]. Показано, что «медленный» аллель гена *EPHX1* приводит к синтезу фермента со сниженной способностью к гидроксилированию ксенобиотиков. Данные полиморфные варианты четко коррелируют с уровнем ферментативной активности *EPHX1* (табл. 6.6.4).

Полиморфизм *Tyr113His* приводит к снижению активности фермента у гомозигот *S/S* на 50 % и у гетерозигот *S/N* на 25 %. Низкая активность фермента наблюдается у гомозигот или гетерозигот *His113* в комбинации с гомозиготами *His139*. «Среднюю» активность фермента имеют гомозиготы *Tyr113* и *His139* или гетерозиготы *Tyr113* и *His139*.

Таблица 6.6.4

Полиморфизм гена *EPHX1* и активность фермента микросомальной эпоксидгидролазы [234]

Тип ферментативной активности	Фенотип	Генотип	
		экзон 3 Tyr113His полиморфизм	экзон 4 His139Arg полиморфизм
Очень медленный	vS	His 113His	His 139His
Медленный	S	Tyr 113His	His 139His
Промежуточный	N	Tyr 113 Tyr	His 139His
		Tyr 113His	His 139 Arg
Быстрый	F	Tyr 113 Tyr	Arg 139 Arg
			His 139 Arg

У гомозигот *Arg139* и гетерозигот *Arg139* в комбинации с гомозиготами *Tyr113* наблюдается «высокая» активность фермента [234].

Выявлена положительная корреляция «медленного» аллеля гена *EPHX1* с заболеваниями органов дыхания. В сочетании с курением у таких индивидов чаще, чем в среднем в популяции, развиваются респираторные заболевания, а также эмфизема легких и обструктивная пневмония [30]. Отмечена ассоциация некоторых полиморфных вариантов гена ЭГ с различными нарушениями репродуктивной системы (преэклампсия, спонтанные аборт) и онкологическими заболеваниями (рак легких, яичников) [234, 324, 683, 779]. Исследование полиморфизма гена *EPHX1* при Э проведено в нашей лаборатории [218].

При анализе частот аллелей и генотипов двух полиморфных вариантов гена *EPHX1* (*Tyr113His* и *His139Arg*) у больных эндометриозом и в контроле, а также в подгруппах больных с разной тяжестью заболевания выявлены статистически значимые различия. Согласно нашим данным, «медленный» аллель *S* (337C) увеличивает риск развития Э, тогда как «быстрый» *F*-аллель (415G) в целом мало влияет на частоту заболевания [218]. Вместе с тем частота «быстрого» аллеля *F* в подгруппе с тяжелой степенью наружного генитального Э заметно превысила таковую в контрольной группе.

Анализ фенотипического проявления полиморфизма гена *EPHX1* показал повышение в 1,5 раза частоты «медленной» формы эпоксидгидролазы («медленный» *S* и «очень медленный» (very slow) *vS*-фенотип) у больных Э по сравнению с контролем и одновременно двукратное снижение частоты *N* «промежуточного» фенотипа (табл. 6.6.5). Согласно коэффициенту соотношения шансов, низкая ферментативная активность микросо-

Таблица 6.6.5

Распределение частот фенотипов гена *EPHX1* у больных с Э и в контроле

Фенотипы	Контроль		Эндометриоз	
	n	%	n	%
S/vS	25	27,8	54	44,3
F	14	15,6	22	18,0
N	51	56,6	46	37,7
Всего	90	100	122	100

Таблица 6.6.6

Частоты фенотипа гена *EPHX1* у больных с легкой, тяжелой степенями Э и в контроле

Генотипы	Контроль		Легкая степень		Тяжелая степень	
	n	%	n	%	n	%
S/vS	25	27,8	33	48,5	21	38,9
N	51	56,7	28	41,2	18	33,3
F	14	15,6	7	10,3	15	27,8
Всего	90	100	68	100	54	100

мальной эпоксидгидролазы, обусловленная полиморфизмом гена *EPHX1*, увеличивает риск развития Э (OR = 2,06; CI: 95 % 1,16–3,68).

Также выявлены достоверные различия частот S- и F-фенотипов между контрольной группой и подгруппами с легкой и тяжелой формами Э ($p = 0,027$, $\chi^2 = 7,2$ df 2 и $p = 0,022$, $\chi^2 = 7,64$ df 2 соответственно) (табл. 6.6.6).

Можно предполагать, что наличие «медленного» варианта гена микросомальной эпоксидгидролазы приводит к накоплению промежуточных электрофильных метаболитов, способствует возникновению оксидативного стресса и, как следствие, развитию заболевания. Однако выявленная в наших исследованиях ассоциация «медленного» аллеля гена *EPHX1* с легким течением заболевания свидетельствует о том, что клинически более тяжелые формы Э возникают вследствие наличия в геноме каких-то других, пока неизвестных генов-модификаторов. В связи с этим следует отметить, что ряд веществ, в том числе 7,8-оксид бенз(а)пирен, под действием ферментов второй фазы детоксикации могут превращаться в активные канцерогенные метаболиты. Такой эффект наблюдается при сниженной активности ферментов второй фазы.

Вероятно, наличие «быстрой» формы ЭГ при одновременно сниженной активности ферментов второй фазы биотрансформации способствует активации и накоплению «вредных» метаболитов и, как следствие, провоцирует развитие более тяжелых форм Э.

6.6.1.2.3.2. Гены 2-й фазы детоксикации

Ферменты 2-й фазы детоксикации обеспечивают эффективное превращение промежуточных электрофильных метаболитов в водорастворимые, нетоксические соединения, которые выводятся из организма.

Глютатион-S-трансферазы (GST) относятся к семейству изоферментов, контролирующих конъюгацию различных электрофильных соединений, включая канцерогены и цитотоксические лекарства, с восстановленным глютатионом. Эти ферменты способны к прямому связыванию с такими гидрофобными соединениями, как **гем, билирубин, стероидные гормоны**, что позволяет им участвовать во внутриклеточном накоплении и обеспечивать транспорт биологических веществ с ограниченной водорастворимостью. Благодаря каталитической активности и способности к связыванию они участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций. В дополнение к этому GST могут подвергаться амплификации в опухолевых тканях и таким образом обеспечивать резистентность к химиотерапии [188].

GSTM1 и ***GSTT1*** — генные семейства глютатион-трансфераз микросомального класса (GST M) и тета-класса (GST T1) особенностью которых является наличие «нулевых» генотипов — генотипов с двумя аллелями, имеющими протяженные делеции, при которых не образуются полноценные ферменты [29]. Частоты таких «**нулевых**» генотипов в разных популяциях варьируют. Анализ полиморфных вариантов гена ***GSTM1*** у представителей белой и черной рас, азиатских индийцев, корейцев, японцев, филиппинцев и жителей Самоа выявил разброс частоты «нулевого» генотипа ***GSTM1* 0/0** от 31 % среди африканцев до 88 % у жителей Самоа. Среди европейцев их частота варьирует от 38 % в Голландии до 62 % в Шотландии.

Частота нулевого генотипа ***GSTT1* 0/0** в европейских популяциях составляет 15–20 %, в азиатских — от 11 % у индийцев до 58 % у китайцев [188, 343, 667, 688]. Как показали проведенные исследования, «функционально неполноценные» варианты генов детоксикации, особенно «нулевые» варианты глютатион-S-трансфераз, приводящие к отсутствию соответствующих белковых продуктов, обнаруживают наиболее выраженную ассоциацию с Э, что впервые было выявлено нами

Таблица 6.6.7

Распределение частот генотипов генов *GSTM1* и *GSTT1* у больных Э разной степени тяжести

Генотипы	Контроль		Эндометриоз		Легкая степень		Тяжелая степень	
	п	%	п	%	п	%	п	%
<i>GSTM1</i> 0/0	37	41,1	65	53,3	35	51,5	30	55,6
<i>GSTM1</i> +	53	58,9	57	46,7	33	48,5	24	44,4
<i>GSTT1</i> 0/0	16	17,8*	41	33,6	20	29,4	21	38,9*
<i>GSTT1</i> +	74	82,2	81	66,4	48	70,6	33	61,1
	90	100	122	100	68	100	54	100

* — $p = 0,005$

еще в 1996 году [470, 698]. Впоследствии эти данные неоднократно подтверждались другими исследователями [378, 379, 503, 820].

Сравнительный анализ частоты делеции (0/0) *GSTM1* гена между выборками больных Э и контролем, а также между подгруппами больных Э различной степени тяжести Северо-Западного региона России не показал статистически значимых различий (табл. 6.6.7).

Вместе с тем частоты «нулевых» гомозигот (0/0) по гену *GSTT1* у больных с наружным генитальным Э оказались вдвое больше, чем в контроле (33,6% и 17,8%) (табл. 6.6.7). Статистический анализ показал, что генотип *GSTT1*0/0 существенно увеличивает риск развития Э и коррелирует с тяжестью патологического процесса. Зарегистрирована прямая зависимость между частотой делеции гена *GSTT1* и тяжестью Э. Максимальная частота генотипа *GSTT1*0/0 (38,9%) отмечена у больных с тяжелой степенью Э. Согласно коэффициенту соотношения шансов, генотип *GSTT1*0/0 увеличивает риск развития тяжелой степени эндометриоза ($OR = 2,94$; $CI: 95\% 1.38-6.25$) [217]. В отличие от наших данных аналогичные исследования на японской и английской популяциях не выявили ассоциации «нулевых» генотипов по *GSTM1* и *GSTT1* с риском развития заболевания [628, 645]. Анализ частоты «нулевых» генотипов по генам *GSTM1*, *GSTT1* в группе больных аденомиозом, а также в контрольной группе не выявил статистически достоверных различий [85].

NAT2 — ген, продукт которого ариламин-N-ацетилтрансфераза-2 играет важную роль в ацетилировании ароматических и гетероциклических аминов.

Аллельные варианты *NAT2* гена связаны с точковыми мутациями, большинство из которых нарушает каталитические функции и/или ста-

Таблица 6.6.8

Распределение частот генотипов и аллелей гена *NAT2* у больных Э разной степени тяжести

Гено- типы	Контроль		Эндометриоз		Легкая степень		Тяжелая степень	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S/S</i>	43	47,8	61	50,0	36	52,9	36	52,9
<i>S/F</i>	33	36,7	42	34,4	20	29,4	20	29,4
<i>F/F</i>	14	15,6	19	15,6	12	17,6	12	17,6
Всего	90	100	122	100	68	100	68	100
Аллели								
<i>S</i>	119	66,1	164	67,2	92	67,6	92	67,6
<i>F</i>	61	33,9	80	32,8	44	32,4	44	32,4

бильность фермента. Существуют по крайней мере 13 аллельных вариантов гена *NAT2*. Различают «медленные» ацетиляторы — гомозиготы по мутантному гену, и «быстрые» — гомозиготы либо гетерозиготы по исходному аллелю (аллель «дикого» типа). Популяционные исследования выявили 40–60% «медленных» ацетиляторов среди представителей белой расы и всего 10–20% таковых у субъектов желтой расы (японцы и канадские эскимосы) [188]. Ряд работ посвящен исследованию ассоциации полиморфных вариантов гена *NAT2* с Э [282, 552, 688, 478], однако полученные результаты противоречивы и не подтверждают ассоциации Э с каким-либо аллельным вариантом гена *NAT2* или его генотипом. Мы провели анализ четырех полиморфных вариантов гена *NAT2*: одного «быстрого» (немутантного) *F*-аллеля и трех аллелей, приводящих к снижению ферментативной активности белка (С481Т (аллель *S1*), G590А (аллель *S2*) и G857А (аллель *S3*)). Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей гена *NAT2* между выборками больных с эндометриозом и контролем, а также между подгруппами больных не выявил статистически значимых различий (табл. 6.6.8) [30, 217].

6.6.1.2.3.3. Сочетания нескольких генов системы детоксикации

Нет сомнения, что сниженная активность или отсутствие некоторых ферментов фазы 2 способствуют длительному сохранению токсических промежуточных продуктов биотрансформации, что способствует развитию Э. Следует отметить, что *S/S*-форма *NAT2*, характеризующаяся более «медленным» ацелированием, и делеционные формы генов

Таблица 6.6.9

Частоты различных сочетанных генотипов по генам системы детоксикации у больных Э и в контроле

Генотипы	Контроль n = 90 (%)	Эндометриоз n = 122 (%)	p	OR
<i>GSTM1</i> 0/0+ <i>GSTT1</i> 0/0	4 (4,4)	22 (18,9)	0,0025	4,99; CI95% 1,81–13,76
<i>GSTT1</i> 0/0+ <i>NAT2</i> S/S	5 (5,6)	22 (18,0)	0,0071	3,74; CI95% 1,63–8,59
<i>EPHX1</i> S+ <i>GSTM1</i> 0/0	11 (12,2)	29 (23,8)	0,034	2,24; CI95% 1,06–4,71
<i>GSTM1</i> 0/0 + <i>GSTT1</i> 0/0+ <i>NAT2</i> S/S	1 (1,1)	13 (10,7)	0,006	10,61; CI95% 1,99–56,61
<i>GSTM1</i> 0/0+ <i>GSTT1</i> 0/0+ <i>EPHX1</i> S	2 (2,2)	11 (9,0)	0,041	4,36; CI95% 1,58–17,97
<i>GSTT1</i> 0/0+ <i>EPHX1</i> S+ <i>NAT2</i> S/S	1 (1,1)	8 (6,6)	0,05	6,2; CI95% 1,01–38,13
<i>GSTM1</i> 0/0+ <i>GSTT1</i> 0/0+ <i>NAT2</i> S/S+ <i>EPHX1</i> S	0 (0)	5 (4)	0,05	6,2; CI95% 1,01–38,13

GSTT1 и *GSTM1*, приводящие к отсутствию соответствующих ферментов, рассматриваются как факторы риска таких онкологических заболеваний, как рак легкого, мочевого пузыря, неполипозный рак толстой кишки, рак молочной железы [30]. Известны и некоторые формы онкологических заболеваний у индивидов с «быстрыми» формами ферментов мЭГ и N-ацетил-трансферазы [234].

Наиболее четкая ассоциация с Э прослеживается в отношении «функционально ослабленных» генотипов по генам фазы 2 системы детоксикации. В наших исследованиях были получены достоверные различия частот следующих сочетанных генотипов: *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0; *GSTT1* 0/0 + *NAT2* S/S; *EPHX1* S + *GSTM1* 0/0. Частоты различных сочетанных генотипов по генам системы детоксикации у больных Э и в контроле приведены в таблице 6.6.9. Наличие хотя бы одного из этих сочетанных генотипов существенно увеличивает риск развития Э. Так, в случае генотипа *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 риск Э увеличивается почти в 5 раз (рис. 6.6.5), *GSTT1* 0/0 + *NAT2* S/S — более, чем в 3,5 раза, тогда как каждый в отдельности «функционально неполноценный» генотип (*GSTM1* 0/0 и *NAT2* S/S) не ассоциирован с развитием Э (см. выше) [12, 69]. Интересно отметить, что анализ сочетания «функционально ослабленных» генотипов по генам *GSTT1* и *GSTM1* обнаружил четкую корреляцию между раз-

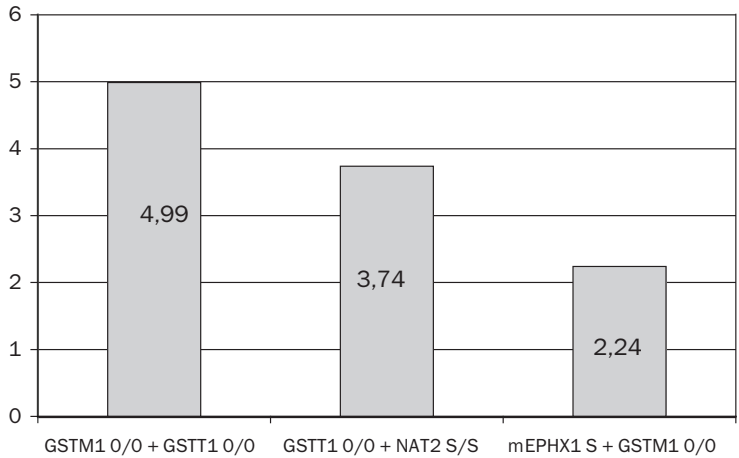


Рис. 6.6.5. Риск развития эндометриоза при сочетании двух функционально неблагоприятных генотипов

OR

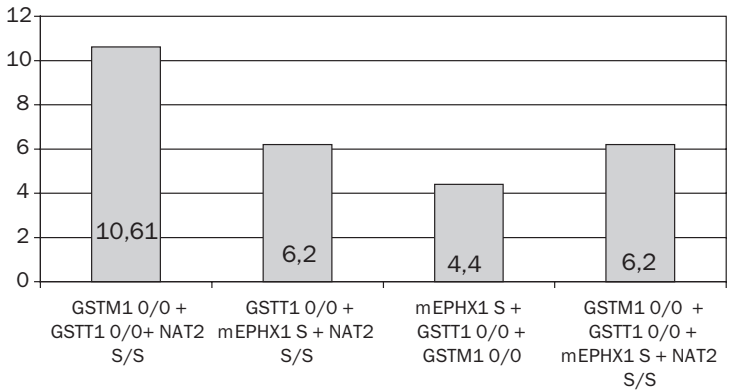


Рис. 6.6.6. Риск эндометриоза при сочетании трех и четырех «функционально ослабленных» генотипов

витием аденомиоза и наличием генотипа *GSTT1* 0/0 + *GSTM1* 0/0, который увеличивал риск заболевания почти в 3,5 раза [85].

Еще более четкие закономерности отмечены при анализе сочетаний трех и четырех «функционально ослабленных» генотипов по генам системы детоксикации. Нами показано, что сложный сочетанный генотип по трем генам *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 + *NAT2* S/S увеличивает риск развития Э в 10 раз (рис. 6.6.6).

Таблица 6.6.10

Распределение частоты сочетанных генотипов в контроле и в подгруппах больных с легким и тяжелым течением эндометриоза

Генотипы	Контроль (n = 90)		Легкая степень (n = 68)		Тяжелая степень (n = 54)	
	n	%	n	%	n	%
<i>GSTM1</i> 0/0 + <i>GSTT1</i> 0/0	4	4,4*	10	14,7*	13	24,1*
<i>GSTM1</i> 0/0 + <i>NAT2</i> S/S	17	18,9**	22	32,4**	14	25,9
<i>GSTT1</i> 0/0 + <i>NAT2</i> S/S	5	5,6**	10	14,7**	12	22,2*
<i>EPHX1</i> S + <i>GSTM1</i> 0/0	16	17,8**	17	25,0**	12	22,2
<i>EPHX1</i> S + <i>GSTT1</i> 0/0	6	6,7**	10	14,7	8	14,8
<i>EPHX1</i> S + <i>NAT2</i> S/S	15	16,7	16	23,5**	5	9,3**
* p < 0,01, ** p < 0,05						

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии синергичного эффекта в отношении наружного генитального Э и аденомиоза при сочетании в геноме нескольких «функционально неполноценных» генотипов по генам системы детоксикации.

При этом для некоторых из таких сочетаний (*GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 + *NAT2* S/S) отмечена выраженная корреляция частоты с тяжелыми формами Э (табл. 6.6.10).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при определенных неблагоприятных сочетаниях аллелей генов системы детоксикации патологический процесс имеет не проградиентное течение (от легких форм I и II стадий с единичными гетеротопиями к более тяжелым III и IV стадиям), а начинается сразу в виде многочисленных эндометриоидных имплантантов в различных органах и тканях. Обширные поражения внутренних органов эндометриоидными гетеротопиями (по типу метастазирования) происходят на фоне гормональных нарушений и истощения резервных возможностей иммунной системы, усиливающих в случае тяжелого течения заболевания.

Анализ сочетанных генотипов генов метаболизма при Э проводился и другими исследователями. При этом рассматривались комбинации генов *GSTM1*, *GSTT1* с аллельными вариантами генов *CYP1A1* и *CYP19A1*. Так, в исследованиях больных Э Великобритании и Греции был проведен анализ сочетаний полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTT1* и MspI-полиморфизма гена *CYP1A1* и выявлено наличие ассо-

циации только с генотипом *GSTM1* 0/0 + *CYP1A1* (Msp1-полиморфизм) [378, 645]. Анализ этих же полиморфных вариантов у больных с Э Южной Индии выявил ассоциацию заболевания только с генотипом *GSTM1* 0/0 [478]. Исследования в Японии не выявили достоверных различий в частотах полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTT1* между больными с Э и группой контроля [628]. Вместе с тем анализ комбинации *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* (Msp1-полиморфизм) и *CYP19A1* показал наличие ассоциации генотипа *GSTM1* 0/0 + *CYP1A1* (Msp1-полиморфизм) и аллеля (*TTTA*)₁₀ гена *CYP19A1* в 4 интроне с развитием Э [378]. Интересно, что, в отличие от наших данных, ни в одной из вышерассмотренных популяций генотип *GSTT1* 0/0 отдельно или в сочетании с другими генотипами генов детоксикации не обнаруживал сцепления с Э.

Анализ имеющихся данных свидетельствует о том, что не столько аллельные варианты отдельных генов системы детоксикации, сколько неблагоприятные сочетания сразу **нескольких генов первой фазы и второй фазы детоксикации обнаруживают выраженную ассоциацию с Э** и в определенной степени определяют тяжесть патологического процесса.

6.6.1.2.4. Другие возможные гены-кандидаты эндометриоза

Попытки прямого картирования генов, ответственных за развитие Э, пока не увенчались заметным успехом. Путем молекулярно-генетического анализа семей высокого риска в нескольких поколениях был выявлен ряд возможных генов-кандидатов; некоторые из них, по-видимому, ответственны за перерождение эндометриоидной ткани в эндометриоидный рак. Таковыми являются гены ***RASK*, *GALT*, *P53*, *APOA2*, *HOX10*, *HOX11***. Некоторые из этих генов, например ***P53***, относятся к супрессорам онкогенов, то есть их продукты подавляют пролиферативную активность клеток. Мутации таких генов не только активируют доброкачественный рост эндометриоидных клеток в эктопических местах, но и непосредственно связаны с малигнизацией таких клеток.

Гены, такие как ***GALT*** — **галактоза-2-фосфат уридил трансфераза**, ***HOX10* и *HOX11***, условно могут быть отнесены к «ранним генам», то есть генам, экспрессирующимся на ранних стадиях эмбриогенеза человека и участвующим в процессах морфогенеза женских репродуктивных органов. Мутации этих генов могут непосредственно влиять на трансформацию клеток нормального эндометрия в эндометриоидные клетки [5].

Так как генитальный Э относится к заболеваниям опухолевой природы, большой интерес представляет изучение полиморфных вариан-

тов генов, обеспечивающих удаление поврежденных и потенциально опасных клеток.

P53 — онкосупрессор, его продукт белок P53 контролирует ответ клетки на различные виды стресса, включая повреждения ДНК химическими и физическими агентами, нарушения микротрубочек цитоскелета, активацию онкогенов, гипоксию, гипертермию и др. Активация гена *P53* ведет к остановке пролиферации клетки и к включению в ней программы апоптоза — запрограммированной клеточной гибели. Инактивация гена *P53*, наблюдаемая в большинстве опухолей, подтверждает его противоопухолевую функцию.

В наших исследованиях при анализе инсерционно/делеционного (*ins/del*) полиморфизма гена *P53* не выявлено статистически достоверных различий в распределении частот генотипов в группе больных аденомиозом по сравнению с таковой в контрольной выборке [69, 85]. Однако частота гетерозигот по инсерции у пациентов оказалась почти в 2 раза выше, чем в контрольной группе (24,6 и 12,5 % соответственно, $p < 0,05$, *df*1). Интересно, что гомозиготы по инсерции (*ins/ins*) в контрольной группе отсутствовали и были зарегистрированы только у пациентов с Э.

Согласно коэффициенту соотношения шансов риск развития эндометриом яичников при наличии аллеля *ins* гена *P53* в 3 раза выше популяционного ($OR = 3,1$; $CI: 1,32-7,29$), а у гомозигот *ins/ins* риск Э увеличен в 10 раз по сравнению с таковым у гомозигот *del/de* ($OR = 10,1$; $CI: 1,22-92,6$). Предполагают, что инсерция 16 нуклеотидов в 3 интроне гена *P53* ведет к возникновению альтернативного сайта сплайсинга и появлению белка с измененными функциями. Нельзя, однако, исключить, что данный полиморфизм тесно сцеплен с какой-то другой мутацией гена *P53*, присутствие которой и определяет наличие такой ассоциации. Нет сомнений в том, что дальнейшее углубленное изучение роли *ins/del* полиморфизма гена *P53* в патогенезе Э и аденомиоза заслуживает пристального внимания.

Другим наиболее изученным полиморфизмом гена *P53* является замена пролина на аргинин в 78 положении белка (*Arg72Pro*), который подробно исследован в связи с тестированием наследственной предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Согласно данным ряда авторов, у гомозигот *Arg/Arg* и *Pro/Pro* отмечается неслучайная ассоциация с некоторыми формами рака [474, 598]. Ассоциация этого полиморфизма с Э изучена недостаточно. Впервые в 2002 году была показана ассоциация Э с аллелем *Pro* [759]. Установлено, что у гетерозигот *Pro72Arg* и у гомозигот *Pro72Pro* риск Э почти в 4 раза больше,

чем у *Arg72Arg* гомозигот. Эти результаты не нашли подтверждения в работе итальянских авторов [458]. Наши результаты также не подтвердили наличия четкой ассоциации *Pro*-аллеля с развитием наружного генитального Э. Однако частота гомозигот по этому аллелю у пациентов с Э в 3 раза превысила таковую в контрольной группе [69].

Согласно последним данным, большинство эндометриом яичников (IV стадия Э) имеют моноклональное происхождение, то есть являются потомками единичных клеток. Это означает, что патологический процесс, по крайней мере изначально, затрагивает лишь единичные клетки эндометрия, которые приобретают способность к пролиферации, имплантации и дают начало колониям эндометриоидной ткани в экстрапеческих местах. Полиморфные варианты гена *P53*, по-видимому, снижают способность клеток к апоптозу, вследствие чего не происходит запрограммированного удаления дефектных клеток, что и является причиной патологического опухолеподобного процесса, свойственного Э. При этом неблагоприятные аллельные варианты генов системы детоксикации могут существенно усиливать клеточный стресс, который в значительной мере реализуется через экспрессию гена *P53*. Неблагоприятные аллельные варианты генов гормональных функций и цитокинов модулируют уже начавшийся патологический процесс, влияя на его скорость и степень распространенности.

6.6.1.2.5. Генетические аспекты лечения эндометриоза

Как следует из вышеизложенного, причины возникновения Э во многом остаются невыясненными. В равной степени спорными остаются вопросы его диагностики и лечения. Очевидно, что недостаточное понимание основных механизмов патогенеза заболевания не позволяет добиться должной эффективности лечения. Хирургическое лечение зачастую не способствует восстановлению специфической функции женского организма и не исключает рецидивов заболевания. Основным направлением консервативной терапии больных Э является восстановление нарушенного гормонального и иммунного статусов [45].

Согласно гипотезе, проверенной в экспериментах на обезьянах [392], рост перитонеальных эндометриоидных имплантантов зависит от уровня эстрогена и прогестерона. При гипоэстрогении и гипопрогестеронемии отмечается атрофия ткани эндометрия. Именно эти гормональные ответы составляют физиологическую основу для гормонотерапии при Э. Однако чувствительность рецепторов стероидных гормонов в гетеротопиях снижена или изменена, что может объяснять

повышенную резистентность Э к действию гормональных препаратов. Согласно данным литературы, не менее чем у 78% пациенток, получавших медикаментозную терапию, отмечается рецидив заболевания [45, 125, 225]. Кроме того, длительное применение гормональных препаратов может спровоцировать развитие остеопороза и, как следствие, увеличение ломкости костей [430]. Наличие сопутствующей соматической патологии затрудняет проведение гормонотерапии, способствует развитию аллергических реакций и других побочных эффектов.

Современная терапия Э является комбинированной и предусматривает как хирургическое вмешательство, так и медикаментозное лечение [45]. Центральной догмой, определяющей стратегию современной гормональной терапии Э, являются данные о том, что гормоны яичников — главные регуляторы роста и функционирования эндометрия. Большинство эндометриальных имплантантов содержат эстрогеновые, прогестероновые и андрогенные рецепторы. Эстрогены стимулируют рост этих имплантантов, а андрогены способствуют их атрофии. Поэтому наиболее распространенными в терапии Э являются средства, обладающие прямым или опосредованным действием на метаболизм стероидов [45, 393, 720]. Исходя из этого для гормонального лечения Э широко применяются антагонисты, которые связываются с рецепторами и блокируют действие эндогенных гормонов, а также агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона (синтетические аналоги эндогенных гормонов) и прогестгена. Зачастую используется и иммуномодулирующая терапия [125, 225].

Принимая во внимание важную роль ферментов системы детоксикации в метаболизме гормонов и защите организма от ксенобиотиков, в том числе от лекарственных препаратов, представлялось логичным оценить непосредственно в клинике эффективность лечения Э в зависимости от состояния генов системы детоксикации у пациенток. Можно было предполагать, что эффективность лечения, наличие побочных эффектов гормональной терапии у одних больных и их отсутствие у других обусловлены функционально неполноценными аллелями генов, кодирующих ферменты метаболизма.

Нами проведен ретроспективный анализ результатов медикаментозного лечения Э в зависимости от паттерна аллелей следующих генов метаболизма: *CYP1A1*, *CYP19A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2* и *EPHX1*. В зависимости от эффективности лечения были выделены две группы больных Э: чувствительная (группа 1 — 51 пациентка) и рефрактерная (группа 2 — 71 пациентка) к медикаментозной терапии.

Достоверных различий в распределении частот генотипов и аллелей полиморфизма **A2455G гена *CYP1A1*** (замена изолейцина на валин в 462 положении белка — Ile462Val) между обеими группами больных не выявлено. Вместе с тем частота аллеля *F* («быстрая» форма фермента) гена *CYP1A1* у больных, рефрактерных к медикаментозному лечению (группа 2), вдвое превысила таковую в группе 1 (5,6 против 2,9% соответственно), однако полученные различия статистически не достоверны.

Достоверные различия в частотах аллелей и генотипов между группами больных Э выявлены при анализе двух полиморфных вариантов гена *CYP19A1* (**TTTA)_N в интроне 4 и del(TCT)**). Так, наличие аллеля **D (del(TCT))** существенно повышает резистентность больного Э к проводимой медикаментозной терапии (OR = 2,09; CI: 95 % 1,14–3,83). Резистентных к медикаментозному лечению достоверно выше в случае генотипа (TTTA)_{II}/(TTTA)_{II}, тогда как у пациенток группы 1 достоверно чаще встречается генотип (TTTA)_{II}/(TTTA)_{II}. Согласно коэффициенту соотношения шансов, у пациенток (TTTA)_{II}/(TTTA)_{II} устойчивость к медикаментозному лечению возрастает в 4 раза (OR = 4,34; CI: 95 % 1,79–10,55), тогда как генотип (TTTA)_{II}/(TTTA)_{II} способствует более эффективному лечению (OR = 0,21; CI: 95 % 0,72–0,06) [5, 217]. Считается, что фермент ароматаза — продукт гена *CYP19A1* играет ключевую роль в патогенезе Э и является основным ферментом в биосинтезе эстрогенов. Выявленные достоверные различия частот некоторых генотипов по гену *CYP19A1* у больных с разной эффективностью лечения свидетельствуют о важной роли полиморфизма гена *CYP19A1* в лекарственной терапии Э.

Анализ двух полиморфных вариантов гена *EPHX1* (**T337C (Tyr113His)** — 3 экзон, **A415G (His139Arg)** — 4 экзон) у больных Э с различным эффектом медикаментозного лечения достоверных различий в частотах аллелей и генотипов не выявил. Вместе с тем частота фенотипически быстрой формы *F EPHX1* («быстрый» фермент) (см. 6.1.2.3.1, табл. 6.6.4) в группе 1 более чем в 2 раза превысила таковую в группе 2. Таким образом, наличие *F*-фенотипа у пациенток с Э следует рассматривать как фактор, благоприятствующий проведению лекарственной терапии.

Нами также были выявлены достоверные различия частот «нулевых» гомозигот (0/0) по гену *GSTM1* в группах больных с различным эффектом лекарственной терапии (рис. 6.6.7). Согласно коэффициенту соотношения шансов, генотип *GSTM1* 0/0 ассоциирован с повышенной устойчивостью больного к консервативному лечению (OR = 2,2; CI: 95 % 1,01–4,13).

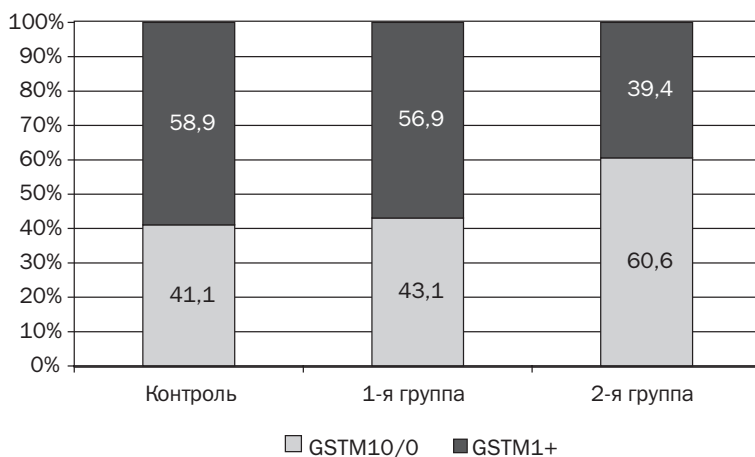


Рис. 6.6.7. Распределение частот генотипов гена *GSTM1* у больных Э, чувствительных (группа 1) и рефрактерных (группа 2) к лечению в сравнении с контролем

В отличие от *GSTM1*, сравнительный анализ частоты гомозигот по делеции (0/0) гена *GSTM1* в группах пациентов с разной эффективностью лечения достоверных различий не выявил (рис. 6.6.8).

Вместе с тем у пациенток с Э, устойчивых к лечению гормонами, частота функционально неблагоприятного генотипа *GSTM1* 0/0 оказалась выше, чем у пациенток в группе 1, и достоверно превысила таковую в контроле (рис. 6.6.8). Уместно напомнить, что при анализе аллельных частот этих генов у больных и здоровых наблюдалась обратная зависимость: достоверная ассоциация с Э установлена для гена *GSTM1* и отрицательная — для *GSTM1* (см. 6.1.2.3.2). Таким образом, развитие Э и эффективность его лечения ассоциированы с разными классами глутатион-S-трансфераз.

Функции глутатион-трансфераз в организме весьма многообразны. Помимо процессов детоксикации ксенобиотиков, связывания и нейтрализации свободных радикалов, эти ферменты выполняют важную роль в повышении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, принимают непосредственное участие во внутриклеточном транспорте гормонов, в биосинтезе ряда биологически активных веществ (простагландинов). При этом функции и субстратные специфичности различных форм GST перекрываются [126].

В связи с тем, что глутатион-S-трансферазы связывают стероидные гормоны и обеспечивают их внутриклеточный транспорт [29; 188], они могут влиять на эффективность доставки гормонов к эндометрию.

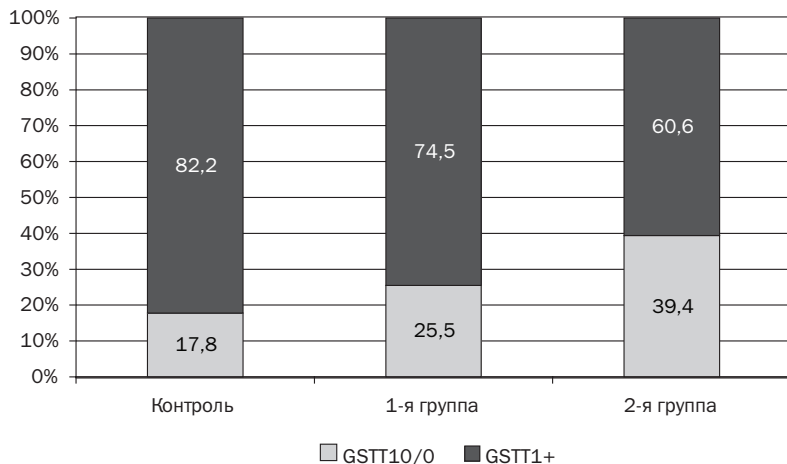


Рис. 6.6.8. Распределение частот генотипов гена *GSTT1* у больных Э чувствительных (группа 1) и рефрактерных (группа 2) к лечению и в контроле

идным очагам. Естественно, что при этом лечебный эффект экзогенных гормонов может снижаться. Кроме того, не исключено, что избыток активных промежуточных метаболитов при дефиците ферментов второй фазы детоксикации также может негативно сказываться на эффективности гормональной терапии. Однако все эти предположения требуют дальнейших исследований.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности генетического тестирования больных Э с целью оптимизации стратегии лечения (оперативное, медикаментозное) и выбора тактики консервативного лечения. Наличие «быстрой» формы *CYP1A1*, аллеля *D* и/или генотипа $(TTTA)_{\neq}/(TTTA)_{II}$ *CYP19A1*, «медленной» формы *EPHX1*, гомозиготность по «нулевому» аллелю *GSTM1* (0/0) предполагает малую эффективность консервативной (гормональной) терапии Э. Наоборот, «медленную» форму *CYP1A1*, генотип $(TTTA)_{II}/(TTTA)_{II}$ *CYP19A1*, «быструю» форму *EPHX1* и +/- (или +/+) генотип *GSTM1* следует рассматривать как благоприятные прогностические признаки успешного консервативного лечения (рис. 6.6.9).

Закключение

Эндометриоз — сложное многокомпонентное мультифакториальное заболевание, в патогенез которого вовлечены как локальные, так и интегральные генные сети и сотни различных генов-кандидатов. Не

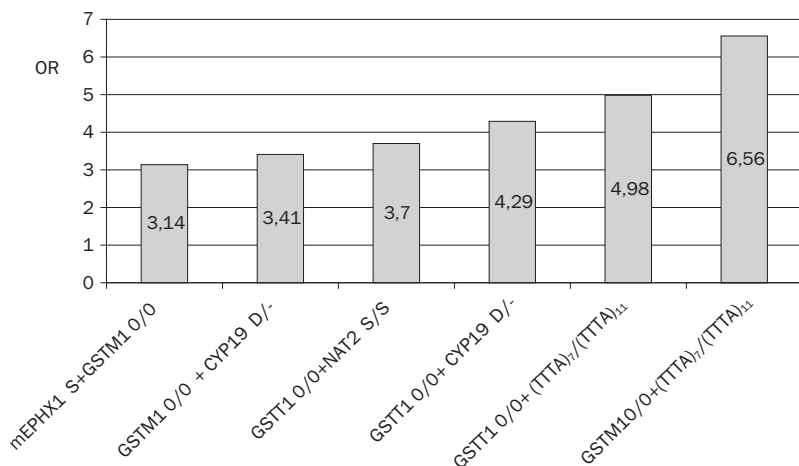


Рис. 6.6.9. Коэффициент соотношения шансов риска развития резистентности к лечению Э гормонами при некоторых сочетаниях генотипов

исключено, что, как и в случае других мультифакториальных болезней, первичное слабое метаболическое звено, запускающее патологический процесс, может быть различным. Однако уже на клеточном уровне процесс становится канализированным, приобретает характерные фенотипические черты, приводящие в конечном счете к весьма сходным патоморфологическим и клиническим проявлениям.

К настоящему времени исследованы более десятка генов-кандидатов, предположительно ассоциированных с Э, относящихся к генным сетям, определяющих метаболизм стероидных гормонов (*ERα*, *CYP19A1*), систему детоксикации ксенобиотиков (*CYP1A1*, *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*), иммунную систему (*IL4RA*) и контролирующую пролиферацию клеток (*P53*). Статистически значимых различий частот генотипов и аллелей генов *CYP1A1*(A2455G (Ile462Val)), *CYP2E1*(C9896G), *CYP19A1*((*TTTA*) n повтор и *del(TCT)*), *NAT2* (*C481T*, *G590A*, *G857A*) у больных Э в сравнении с контролем выявлено не было. Достоверная ассоциация с Э была установлена для двух полиморфных вариантов гена *EPHX1* (Tyr113His — 3 экзон, His139Arg — 4 экзон) и для «нулевого» генотипа по гену *GSTT1* (0/0). «Медленный» аллель гена микросомальной эпоксидгидролазы почти вдвое увеличивает вероятность Э, а при генотипе *GSTT1* 0/0 риск Э возрастает в 2,5 раза. Неблагоприятный вариант полиморфизма A1902G гена рецептора интерлейкина-4 (*IL4R*), увеличивает вероятность Э почти в 13 раз!

Наиболее четкая ассоциация с Э получена в отношении неблагоприятных сочетанных генотипов по генам системы детоксикации. Так, сочетание *GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0 увеличивает риск Э почти в 5, а генотип *GSTM1* 0/0+*GSTT1* 0/0+*NAT2* S/S — в 10 раз. Интересно, что эти сочетания включают в себя полиморфные варианты некоторых генов (*GSTM1* 0/0 и *NAT2* S/S), которые сами по себе, при индивидуальном тестировании, не сцеплены с Э. Установлена четкая ассоциация некоторых «функционально ослабленных» генотипов с тяжестью заболевания. Можно предполагать, что сниженная активность или отсутствие некоторых ферментов фазы 2 детоксикации нарушают процессы естественного метаболизма эндогенных и экзогенных субстратов, способствуют более длительному сохранению в организме промежуточных токсичных продуктов биотрансформации ксенобиотиков, что и может провоцировать развитие патологических процессов, связанных с Э.

Таким образом, тестирование генов фазы 2 системы детоксикации можно рассматривать как метод досимптоматического выявления женщин с наследственной предрасположенностью к этому тяжелому заболеванию.

Генетическое тестирование больных Э целесообразно для оптимизации выбора стратегии и тактики лечения. Наличие быстрой формы *CYP1A1*, «функционально ослабленных» аллелей *D CYP1A1*, медленной формы *EPHX1* и гомозиготность по «нулевому» аллелю *GSTM1* (0/0) предполагает неэффективность медикаментозной (гормональной) терапии. «Медленная» форма *CYP1A1*, генотип $(TTTA)_{II}/(TTTA)_{II}$ *CYP1A1*, «быстрая» форма *EPHX1* и +/- (или +/-) генотип *GSTM1* следует рассматривать как благоприятные прогностические признаки для успешного консервативного лечения.

Необходимы ретроспективные и, что особенно важно, проспективные исследования результатов генетического тестирования для проверки этих данных и высказанных предположений.

Нет сомнения, что общегеномный скрининг SNP с использованием программы НарМар позволит уже в скором времени идентифицировать все гены и полиморфизм, ассоциированные с Э, и уточнить генные сети этого заболевания. Однако уже на данном этапе вполне реальным и оправданным представляется тестирование наследственной предрасположенности к Э, особенно в семьях высокого риска, а также использование генных тестов с целью прогноза течения заболевания и выработки тактики лечения.

6.6.2. Невынашивание беременности

Введение

Несмотря на достижения современной медицины, проблема невынашивания беременности остается весьма актуальной.

Невынашивание беременности — универсальный интегрированный ответ женского организма на любое неблагополучие здоровья беременной и плода, кумулятивный (интегрированный) ответ на действие неблагоприятных экзогенных и эндогенных факторов [124].

Частота невынашивания беременности составляет от 10 до 25 % всех беременностей. Примерно половина из них приходится на преждевременные роды. В I триместре частота невынашивания беременности достигает 50–70 %, во II — 18–20 % и в III — 7–30 %. Максимальное число самопроизвольных аборт (81,1 %) отмечается в I триместре, причем 38 % из них происходят в течение первых 7–8 недель. Ранний аборт (4–5 недель), который составляет около 8 % всех беременностей, часто остается нераспознанным [183].

Невынашивания беременности в III триместре являются причиной более 50 % мертворождений, 70–80 % ранней неонатальной смертности, 60–70 % детской смертности. Основные причины невынашивания беременности приведены на рисунке 6.6.10.

В структуре невынашивания беременности около 25 % составляет привычный выкидыш [190]. Согласно отечественным авторам, привычное невынашивание беременности ранних сроков предполагает наличие двух и более спонтанных выкидышей до 16 недель [143, 190]. Некоторые зарубежные клиницисты до сих пор относят этот термин к трехкратному самопроизвольному прерыванию беременности до 12-й недели [534].

Известно, что риск потери беременности после первого выкидыша составляет 13–17 %, что соответствует частоте спонтанных выкидышей в популяции, тогда как после 2 предшествующих самопроизвольных прерываний риск потери беременности возрастает более чем в 2 раза и составляет 36–38 %. У женщин, не имеющих живых детей, т. е. страдающих первичным невынашиванием беременности, вероятность выкидыша после третьего самопроизвольного прерывания составляет около 40–45 % [1].

Причины невынашивания беременности весьма многообразны. Среди них одни являются предрасполагающими, а другие — разрешающими. Первые ведут к прерыванию беременности, вызывая измене-



Рис. 6.6.10. Факторы невынашивания беременности

ния со стороны плодного яйца, другие нарушают связь плодного яйца с материнским организмом, то есть первично нарушают процессы имплантации и плацентации.

Существует много классификаций невынашивания беременности. Наиболее полной на сегодня считается классификация, предложенная С. М. Беккером в 1969 году и дополненная в 2002 году Н. Г. Кошелевой и сотрудниками [143].

Причины гибели зародышей в ранние сроки беременности различны. Есть основания рассматривать самопроизвольный выкидыш раннего срока как эволюционный механизм элиминации неполноценного потомства [534].

Одной из ведущих причин невынашивания беременности ранних сроков являются различные генетические факторы (рис. 6.6.11).

На протяжении последних 40–50 лет основными наследственными причинами невынашивания беременности ранних сроков считали хромосомные aberrации, которые регистрируются почти у 70 % абортусов ранних стадий развития [43]. Внедрение в современную генетику новых высокотехнологичных методов молекулярной диагностики существенно расширило понятие «генетика невынашивания беременности». В настоящее время считается, что невынашивание беременности может быть обусловлено не только хромосомными аномалия-

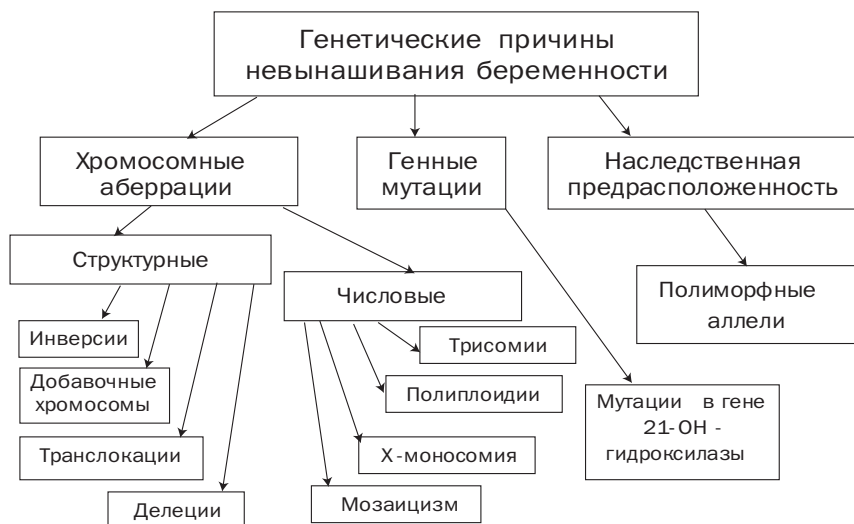


Рис. 6.6.11. Генетические факторы невынашивания беременности

ми, но также и генными мутациями, и быть результатом выраженной наследственной предрасположенности [50] (рис. 6.6.11).

В последнем случае невынашивание беременности можно рассматривать как типичное мультифакториальное заболевание, то есть как интегральный результат экспрессии функционально ослабленных вариантов (аллелей) множества генов на фоне неблагоприятных внешних и внутренних факторов. При этом относительный вклад генетических и средовых составляющих в каждом конкретном случае может быть различным [30, 43, 58].

Генетическая природа невынашивания беременности очень разнообразна и на сегодня включает в себя, по крайней мере, семь различных групп генов, каждая из которых представляет собой вполне самостоятельную генную сеть (рис. 6.6.12).

В течение последних 5–7 лет изучен аллельный полиморфизм более 40 генов, предрасполагающих в определенных условиях к возникновению и развитию невынашивания беременности.

6.6.2.1. Гены второй фазы детоксикации

Исследования последних лет показали, что восприимчивость организма к вредным воздействиям окружающей среды в значительной мере зависит от активности ферментов системы детоксикации ксенобиотиков.

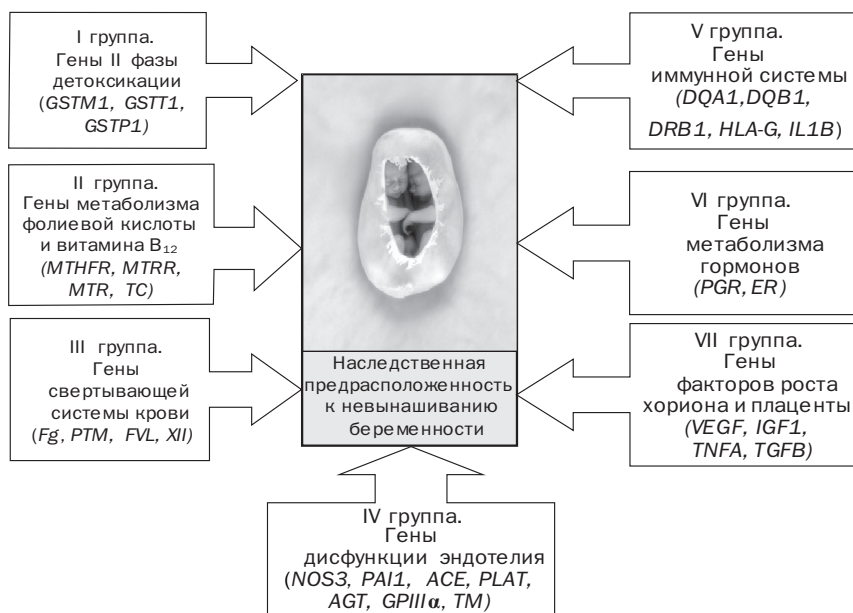


Рис. 6.6.12. Группы генов-кандидатов, ассоциированных с риском невынашивания беременности

При наличии функционально ослабленных вариантов таких генов риск возникновения некоторых частых заболеваний репродуктивной системы (эндометриоза, невынашивания беременности, гестоза, плацентарной недостаточности и др.) увеличивается [30, 50–52, 69, 72, 152, 158, 221].

Группа генов второй фазы детоксикации представлена суперсемейством глутатион-S-трансфераз (GST), которые катализируют взаимодействие глутамата с электрофильными атомами N, C, S, O и отвечают за конъюгацию сульфгидрильных групп с молекулами ксенобиотиков [592]. Глутатион-опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и пероксидов ДНК, восстанавливает органические гидроперекиси в спирты и изомеризует некоторые стероиды и простагландины. Известно, что интенсификация ПОЛ, связанная с полиморфизмом генов системы детоксикации, оказывает токсическое действие на биомембраны клеток. Показано также, что дисбаланс ПОЛ и антиоксидантной системы может быть обусловлен снижением концентрации в крови стероидных гормонов, обладающих антиоксидантными свойствами. Последнее обстоятельство также существенно в патогенезе невынашивания беременности.

Известно, что глутатион-S-трансферазы (GST) присутствуют в самых разных тканях и начинают экспрессироваться уже на ранних эмбриональных стадиях развития [785]. Полиморфизм генов, контролирующих синтез этих ферментов, может приводить к повышению или снижению активности соответствующих ферментов и, таким образом, быть причиной дисбаланса между ферментами первой и второй фаз детоксикации, синхронная активность которых так важна для эффективной детоксикации экзогенных ксенобиотиков и опасных эндогенных метаболитов [30]. Логично предполагать, что следствием такого дисбаланса может быть накопление в организме матери и плода различных токсинов, некоторые из них могут представлять реальную опасность для развивающегося плода.

Впервые в 1996 году была показана ассоциация функционально ослабленных аллелей генов *GSTM1* и *NAT2* с привычной потерей плода на ранних сроках [811]. Сходные данные были получены и рядом других исследователей [469, 664]. Наряду с этими данными некоторые исследователи не обнаружили связи функционально ослабленных аллелей гена *GSTP1* с риском привычного невынашивания беременности [597].

С 1999 по 2007 годы нами были изучены особенности аллельного полиморфизма генов второй фазы детоксикации у 264 супружеских пар с невынашиванием беременности в анамнезе. Была установлена достоверная ассоциация привычного невынашивания беременности с наличием функционально ослабленных аллелей трех генов второй фазы детоксикации *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* [50–52, 72, 152, 158, 221].

Согласно нашим данным, при анализе сочетания генотипов двух генов *GSTM1* и *GSTT1* у женщин с разным количеством выкидышей было установлено (рис. 6.6.13), что гомозиготы по нулевому аллелю двух генов *GSTM1* и *GSTT1* в контроле встречаются только у 5,5% женщин, то есть почти в 3 раза реже, чем у пациенток с разным количеством выкидышей из групп I, II и III (16, 14,4 и 18,9% соответственно, $p < 0,05–0,01$). Рассчитанный коэффициент соотношения шансов показал увеличенный риск возникновения как первого, так и повторных самопроизвольных выкидышей у женщин-носителей «нулевых» генотипов *GSTM0/0*, *GSTT0/0* ($OR = 3,23$; 95% CI: 1,24–8,35) и ($OR = 3,32$; 95% CI: 1,41–7,83).

Был сделан вывод, что тестирование генов второй фазы детоксикации позволяет идентифицировать индивидов с наследственной предрасположенностью к привычному невынашиванию беременности, что определяет тактику ведения таких пациентов и делает возможным своевременную профилактику невынашивания беременности.

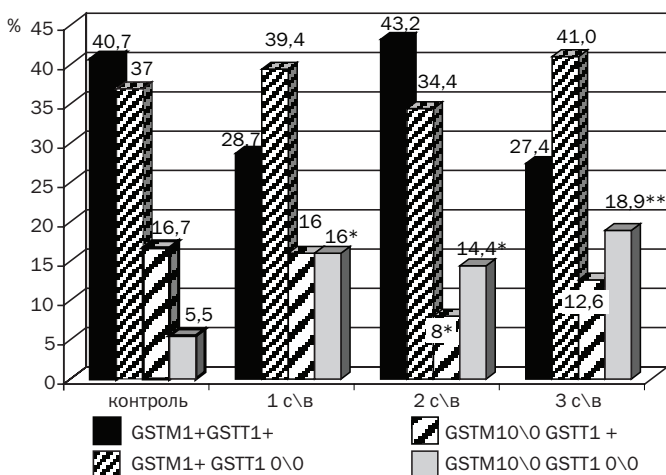


Рис. 6.6.13. Распределение сочетанных генотипов по генам *GSTM1* и *GSTT1* у женщин с разным числом выкидышей в анамнезе и в контроле

* — $p < 0,01$; ** — $p < 0,005$

6.6.2.2. Гены метаболизма фолиевой кислоты и витамина B_{12}

Определенную роль в невынашивании беременности могут играть и гены, принимающие участие в метаболизме фолиевой кислоты и витамина B_{12} . Высокие концентрации активной формы фолиевой кислоты необходимы для превращения гомоцистеина в метионин. Кофакторами ферментов метаболических путей метионина выступают витамины, самыми важными из которых являются фолиевая кислота, пиридоксин (витамин B_6), цианокобаламин (витамин B_{12}) и рибофлавин (витамин B_2). Фолатный цикл является сложным каскадным процессом, в котором задействовано много разных ферментов (рис. 6.6.14). Основными генами, продукты которых контролируют превращение фолиевой кислоты в метаболически активные формы и регулируют обмен гомоцистеина, являются *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктаза), *MTRR* (метионинсинтетазредуктаза), *MTR* (метионинредуктаза) и *TC* (транскобаламинсинтаза). Снижение активности этих ферментов — одна из важных причин накопления гомоцистеина в организме.

Можно выделить несколько возможных причин токсического действия избытка гомоцистеина на организм женщины и плода (рис. 6.6.15).

- Повреждающий эффект гомоцистеина на эндотелий сосудов и стимуляция тромбообразования приводит к развитию ряда осложнений беременности, в том числе к нарушениям плацентации и расстрой-

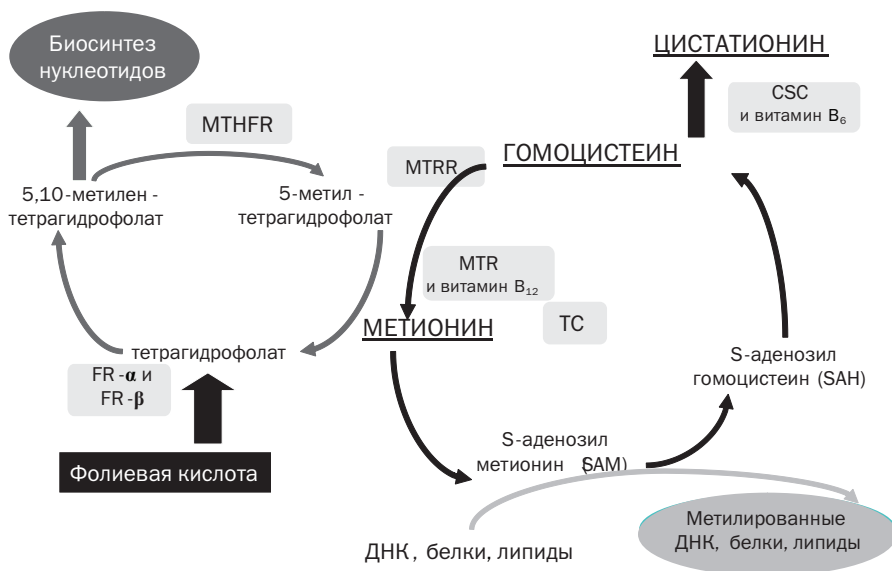


Рис. 6.6.14. Фолатный цикл и цикл метионина

5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) является ключевым ферментом фолатного цикла. Она катализирует превращение 5,10-метилентетрагидрофолата (5,10-CH₂-THF) в 5-метилтетрагидрофолат (5-CH₃-THF) — активную форму фолиевой кислоты. 5-CH₃-THF служит донором метильных групп и основным источником тетрагидрофолата (THF) в витамин B₁₂-зависимом реметилировании гомоцистеина в метионин, катализируемого ферментом метионин-синтазой (MTR). Метионин, в свою очередь, после превращения в S-аденозилметионин (SAM), является основным донором метильных групп, необходимых для метилирования ДНК, РНК, белков и фосфолипидов. При переходе витамина B₁₂ в окисленную форму происходит подавление активности MTR. Для восстановления функции MTR необходимо дополнительное метилирование с помощью фермента метионинсинтазредуктазы (MTRR)

ствам фетоплацентарного кровообращения, результатом чего может быть бесплодие и невынашивание беременности [508, 662].

- Повышенный уровень гомоцистеина на более поздних сроках беременности может быть причиной плацентарной недостаточности и, как результат этого, задержки внутриутробного развития и хронической гипоксии плода [507].
- Отмечена положительная корреляция между уровнем гомоцистеина в крови у беременных и тяжестью гестоза [274].

Как уже отмечалось, наследственная предрасположенность к увеличению уровня гомоцистеина в крови может быть связана с особен-

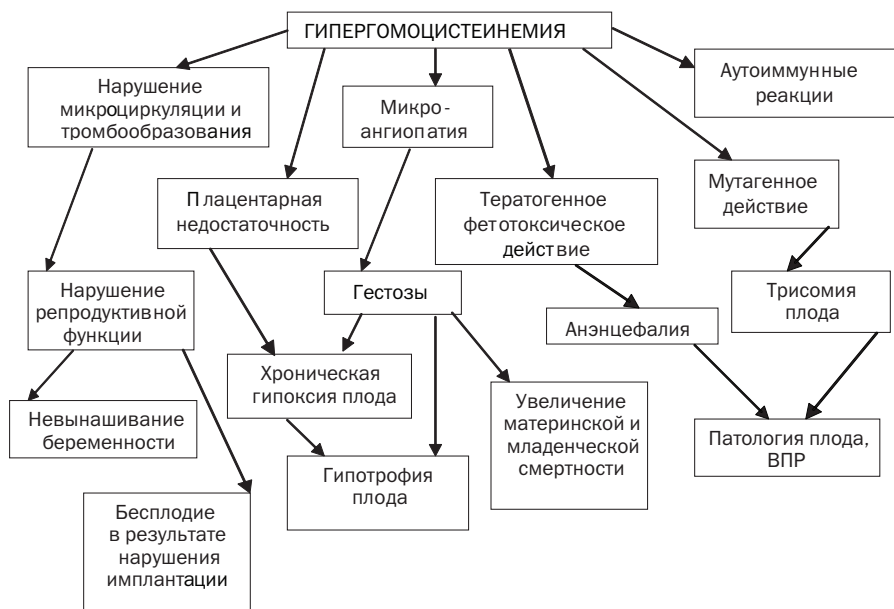


Рис. 6.6.15. Роль гипергомоцистеинемии в развитии акушерской патологии

ностями полиморфизма генов — *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *TC* (рис. 6.6.12). При наличии функционально неблагоприятных полиморфных аллелей в нескольких генах фолатного цикла риск акушерской патологии и, в частности, невынашивания беременности значительно возрастает [693]. В отношении отдельных генов фолатного цикла данные о наличии такой ассоциации пока весьма противоречивы.

Наиболее обстоятельно изучен полиморфизм гена *MTHFR C677T*. В результате точечной мутации цитозин в 677 положении меняется на тимин, а в соответствующем белковом продукте — аланин на валин. Термолabileльный аллель *677T* сопряжен с нарушением фолатного метаболизма, результатом чего является повышение уровня гомоцистеина и тромбофилия. У носителей аллеля *T* во время беременности может быстро развиваться дефицит фолиевой кислоты.

В таблице 6.6.11 суммированы результаты научных работ, посвященных анализу ассоциации С/Т-полиморфизма гена *MTHFR* с невынашиванием беременности. Так, в работах одних исследователей подтверждено, что наличие аллеля *T* гена *MTHFR* повышает риск привычной потери плода в 4–10 раз. Более того, в одном из последних исследований продемонстрирована ассоциация С/Т-полиморфизма гена *MTHFR* даже с

Таблица 6.6.11

Ассоциация T-аллеля полиморфизма C677T гена метилентетрагидрофолат-редуктазы (*MTHFR*) с риском невынашивания беременности

Авторы	Страна/ Год публикации	Число пациентов/ контроль	Результат
Привычные выкидыши в анамнезе			
Foka et al.	Греция, 2000	80/100	Нет риска
Holmes et al.	Великобритания, 1999	173/67	Нет риска
Kutteh et al.	США, 2000	50/50	Нет риска
Lissak et al.	Израиль, 1999	41/18	Повышен риск
Murphy et al.	Ирландия, 2001	40/540	Нет риска
Nelen et al.	Нидерланды, 1997	185/113	Повышен риск
Pihusch et al.	Германия, 2001	102/128	Нет риска
Wramsby et al.	Швеция, 2000	84/69	Нет риска
Один выкидыш в анамнезе			
Alfirevic et al.	Великобритания, 2001	80/100	Нет риска
Martinelli et al.	Италия, 2000	50/50	Нет риска
Murphy et al.	Ирландия, 2000	41/18	Нет риска
У спонтанных абортусов			
Isotalo et al.	Канада, 2000	161/119	Повышен риск
Zetterberg et al.	Швеция, 2003	76/114	Повышен риск

одним самопроизвольным выкидышем раннего срока. В то же время исследователи других стран не обнаружили такой ассоциации.

Согласно некоторым данным, невынашивание беременности ассоциируется с наличием аллеля 677T гена *MTHFR* не только у матери, но и у плода. Как показали исследования абортного материала, аллели *MTHFR* 677T и/или 1298C в гомо- или гетерозиготном состоянии увеличивают риск невынашивания беременности почти в 14 раз [515, 816]. Учитывая важную роль фолиевой кислоты в метаболизме нуклеиновых кислот, а следовательно, и в процессах пролиферации и дифференциации, нарушения работы фолатного цикла крайне опасны для быстро делящихся клеток эмбриона.

Повышение уровня гомоцистеина нередко сопровождается развитием вторичных аутоиммунных реакций и в настоящее время рассмат-

ривается как одна из возможных причин развития антифосфолипидного синдрома (АФС) [446, 693]. Так, в исследовании бразильских ученых [288] у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе и наличием АФС частота аллеля *677T* (40,3%) была достоверно выше, чем в контроле. Именно этот аллель рассматривается в качестве фактора, предрасполагающего к тромбозам при привычном невынашивании беременности.

Для другого полиморфизма гена *MTHFR* A1298C также показана ассоциация с привычным невынашиванием беременности. Повышенная частота генотипов *A/C* и *C/C* гена *MTHFR* была зарегистрирована у женщин с повторными выкидышами раннего срока. Примечательно, что в этих исследованиях ни в одном случае не было обнаружено одновременно двух функционально неблагоприятных вариантов гена *MTHFR* на одной хромосоме (*T*-аллель гена *C677T* и *C*-аллель гена *A1298C*). По всей вероятности, этот факт доказывает выраженное неравновесие по сцеплению между этими мутациями и их независимое возникновение на разных гомологичных хромосомах. Нельзя исключить, однако, что наличие сразу двух замен в гене *MTHFR* одной хромосомы летально для развивающегося зародыша человека. Именно такой аномальный генотип был зарегистрирован в абортном плодном материале [525].

Полиморфизм других генов фолатного цикла (*MTRR* A66G и *MTR* A2756G) также ассоциирован с нарушениями репродуктивной функции. В частности, полиморфизм A66G гена *MTRR* ассоциирован с синдромом Дауна и дефектами спинного мозга (*spina bifida*) [595, 675].

Показано увеличение частоты аллеля *66A* гена *MTRR* и аллеля *2756G* гена *MTR* у женщин с преждевременными родами в анамнезе (после 22-й недели беременности) [403].

6.6.2.3. Гены факторов свертывания крови

Тромботические осложнения составляют серьезную проблему в современном акушерстве. Возникновение микротромбозов при беременности является частой причиной развития разнообразной акушерской патологии (гестоза, плацентарной недостаточности, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, привычной потери плода и др.) [175, 190]. Известно, что в системе гемостаза при неосложненной беременности развивается физиологическая адаптация, характеризующаяся поэтапным усилением общекоагуляционного потенциала крови за счет повышения в 1,5–2,5 раза концентрации

факторов свертывания крови и снижения антикоагулянтного потенциала. Таким образом, при беременности повышается риск тромбофилии, подробно рассмотренной в разделе 6.4 данной главы.

Исследования последних лет показали, что наличие тромбофилии сопряжено с повышенным риском развития осложнений беременности, хотя имеющиеся в научной литературе данные весьма противоречивы.

Наиболее частой причиной тромбофилии является резистентность к активированному протеину С вследствие мутации гена V фактора свертывания крови *F5*, расположенного на коротком плече 1 хромосомы. Известны три мутации этого гена: Лейденская мутация (G1691A FVL), мутация Кембриджа и мутация Гон-гон. Мутация G1691A встречается у 4–6% белого населения и рассматривается как фактор риска развития акушерской патологии. Считается, что данная мутация ответственна почти за 15% всех случаев потери плода. Наличие мутаций гена *F5* в 8 раз повышает риск развития тромбозов и в 10 раз — преждевременную отслойку нормально расположенной плаценты (табл. 6.6.12) [134].

Аутосомно-доминантная мутация G20210A в гене протромбина *F2* (II фактора свертывания крови) встречается у 4–5% населения. Повышенный уровень протромбина обнаружен у 87% носителей данной мутации. При беременности и наличии мутации G20210A риск венозного тромбоза возрастает в 100–1000 раз. Аллель 20210A гена *PTM* коррелирует с повышенной экспрессией гена и является маркером риска развития тромбозов и инфаркта миокарда. Нормальный генотип *G/G* регистрируется у 97% населения. Два других варианта генотипа (*G/A* и *A/A*) ассоциированы с высоким риском развития венозных тромбозов и встречаются у 3 и 0,1% населения соответственно. Этот риск резко возрастает при наличии мутации FVL, а также на фоне других тромбогенных факторов (оральные контрацептивы, неподвижность, беременность, послеродовой период) (табл. 6.6.12).

Некоторые исследователи отмечают увеличение частоты Лейденской мутации у женщин с привычным невынашиванием беременности, другие — в гене *PTM*, третьи — не подтверждают ассоциации этого полиморфизма с привычным невынашиванием беременности (табл. 6.6.12 и табл. 6.6.13). Эти несоответствия могли быть результатом различий в размерах выборок, в особенностях отбора пациентов при формировании групп, в наличии популяционных особенностей. Обращает на себя внимание высокая частота нескольких мутаций в генах свертывания крови у пациенток с невынашиванием беременности.

Таблица 6.6.12

Риск невынашивания беременности у пациенток с наличием Лейденской мутации гена V фактора системы свертывания крови

Авторы научных работ	Страна/ Год публикаций	Число пациенток и контроля	Результат
Alfirevic et al.	Великобритания, 2001	80/100	Повышен риск
Foka et al.	Греция, 2000	80/100	Повышен риск
Kobashi G et al.	Япония, 2005	83/174	Нет риска
Kovalevsky G. et al.	США, 2004	60/60	Повышен риск
Martinelli et al.	Италия, 2000	67/272	Повышен риск
Murphy et al.	Ирландия, 2000	40/540	Повышен риск
Pauer HU et al.	Германия, 2003	101/122	Нет риска
Wramsby et al.	Швеция, 2000	84/69	Повышен риск

Таблица 6.6.13

Риск невынашивания беременности при наличии разных аллелей гена протромбина (*PTM*)

Авторы научных работ	Страна/ Год публикаций	Число пациенток и контроля	Результат
Carp H. et al.	Израиль, 2002	108/82	Нет риска
Foka et al.	Греция, 2000	80/100	OR 4,6
Kutteh et al.	США, 2000	50/50	Нет риска
Pihusch et al.	Германия, 2001	102/128	OR 8,5
Santoro R. et al.	Италия, 2005	150/115	Повышен риск
Wramsby et al	Швеция, 2000	84/69	Нет риска

В нескольких работах выявлено увеличение частоты мутации FVL и мутации G20210A гена *PTM* у женщин с привычной потерей плода на поздних сроках (после 20 недель беременности) [345, 699]. Другие авторы отмечают ассоциацию этих 2 мутаций с повторными самопроизвольными выкидышами как на ранних, так и на поздних сроках [414]. Достоверная ассоциация привычной потери плода в I триместре беременности установлена для генотипа *G/A* гена *PTM* ($p < 0,027$) [769]. В то же время некоторые исследователи не отмечали ассоциации мутаций в генах *F5* и *PTM* с привычным невынашиванием беременности [262]. Согласно другим данным [809], почти 30 % женщин с повторными

выкидышами имеют мутацию FVL, однако частота мутации G20210A гена *PTM* не отличается от контроля (табл. 6.6.13).

Достоверные различия частот мутаций G1691A гена *F5* и G20210A гена *PTM* у пациенток с привычной потерей плода и у здоровых женщин отсутствуют, однако имеется высокодостоверная ассоциация с привычным невынашиванием беременности гетерозиготных генотипов этих генов (G/A — *F5* и G/A — *PTM*) с ПН [421]. Частота генотипа G/A гена *F5* достоверно отличалась в группе женщин с 2 выкидышами (8,5%) по сравнению с пациентками с 3 выкидышами в анамнезе (26,6%, $p < 0,04$). Установлена ассоциация данных генотипов с риском повторных выкидышей как в I, так и во II триместрах. У пациенток с привычной потерей плода во II триместре частота мутаций в обоих генах выше, чем с выкидышами в I триместре беременности.

Тромбофилические осложнения также ассоциированы с наличием мутации G455A в I факторе свертывания крови (ген фибриногена), которая приводит к повышенному уровню фибриногена в крови и/или к изменениям в его структуре. До 20% дисфибриногемий осложняется тромбозами, следствием которых может быть невынашивание беременности и даже привычное невынашивание беременности [134].

Таким образом, большинство авторов на достаточно больших выборках из разных стран подтверждают ассоциацию мутаций в генах свертывания крови, и особенно сочетаний их функционально неблагоприятных аллелей с риском привычной потери плода на разных сроках беременности.

6.6.2.4. Гены функции эндотелия

Главным звеном патогенеза многих акушерских заболеваний (гестоз, плацентарная недостаточность, невынашивание беременности) является эндотелиальная дисфункция. Известно, что эндотелий синтезирует вещества, участвующие в свертывании крови, фибринолизе, регуляции тонуса сосудов и их проницаемости, в ангиогенезе и т. д. При повреждении эндотелиальные клетки продуцируют прокоагулянты, вазоконстрикторы и факторы роста [92, 221].

Существуют единичные исследования, посвященные изучению ассоциации полиморфизма генов, определяющих функции эндотелия.

Исследования последних лет показали, что среди этиопатогенетических факторов риска невынашивания беременности ведущее место принадлежит эндотелиальной дисфункции, как в материнском

организме, так и в фетоплацентарном комплексе и в артериях пуповины [732].

Ген ACE определяет синтез **ангиотензинконвертирующего фермента (ACE)** — ключевого фактора ренин-ангиотензиновой системы, важного звена поддержания равновесия между факторами вазоконстрикции и вазодилатации, а следовательно, и регуляции сосудистого тонуса. Данный фермент контролирует превращения ангиотензина I в ангиотензин II, который является одним из вазоконстрикторов [95, 323]. Изменения концентрации сосудистых метаболитов играют важную роль в становлении и развитии фетоплацентарного комплекса, в регуляции кровообращения в плаценте.

В немногочисленных работах установлена ассоциация полиморфизма гена *ACE* с невынашиванием беременности [677, 761]. Большее значение в регуляции сосудистого тонуса принадлежит полиморфизму инсерция/делеция (I/D) Alu-повтора 287 п. н. в 15 интроне гена *ACE*. Данный полиморфизм ассоциирован с изменением экспрессии гена *ACE* [808]. При этом аллель *D* коррелирует с достоверным увеличением количества ACE в плазме крови, а аллель *I* является функционально менее активным. Показана ассоциация *D*-аллеля гена *ACE* с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в частности с гипертонией [264] и с некоторыми формами гестоза и задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) плода [221, 761]. Выявлены достоверные различия частот генотипов *D/D* гена *ACE* и *4G/4G* гена *PAII* у пациенток с привычным невынашиванием беременности в сравнении с таковыми в контроле [677]. При этом установлена положительная корреляция между наличием данных генотипов и повышением в крови концентрации PAI-1 и гипофибринолиза у женщин с привычной потерей плода.

Ген ангиотензиногена (AGT) является компонентом ренин-ангиотензиновой системы, предшественником ангиотензина-2. Ренин отщепляет от ангиотензиногена декапептид, из которого в дальнейшем образуется ангиотензин-2. Известно, что ангиотензиноген, ангиотензин-2 и рецепторы ангиотензина-2 экспрессируются в течение всей беременности в тканях хориона и эмбриона. Два известных полиморфизма *AGT* гена T174M и M235T являются факторами риска гипертензии, инфаркта миокарда, преэклампсии. Показана ассоциация полиморфизма M235T с повышением уровня ангиотензиногена в крови [509]. Отмечено достоверное повышение частоты генотипа *T/T* полиморфизма M235T гена *AGT* у родильниц с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) плода, раз-

вившейся как на фоне преэклампсии ($p < 0,01$), так и без нее ($p < 0,001$) [232]. Установлено достоверное повышение частоты данного генотипа и у новорожденных с задержкой внутриутробного развития ($p < 0,001$).

Ген ингибитора тканевого активатора плазминогена тип 1 (PAI) является центральным компонентом фибринолитической системы. Он ингибирует урокиназу, протеин-С и тканевой активатор плазминогена. Полиморфизм 4G/5G гена *PAI* ассоциирован с активностью PAI-1 в крови, при этом аллель 4G связан с более высоким уровнем PAI-1. Данный полиморфизм является фактором риска развития тромбозов, инфаркта миокарда, гестоза, гипотрофией плода, мертворождением и т. д. [739].

Важную роль в развитии этих процессов играет образование вазоактивных веществ. Среди них особое место принадлежит оксиду азота (NO), обладающему выраженными вазодилаторными свойствами [19]. Оксид азота, по современным представлениям, играет роль универсального регулятора множества физиологических процессов, включающих в себя поддержание сердечно-сосудистого гомеостаза, иммунного статуса, цитотоксической активности макрофагов и т. д.

Синтезировать NO способны многие клетки организма, в том числе клетки эндотелия сосудов, некоторые нейроны, тромбоциты, клетки мозгового слоя надпочечников, макрофаги и т. д. [481]. Известно, что NO синтезируется в трофобласте, плаценте и миометрии [249, 311, 312, 419].

В гене эндотелиальной нитрооксидсинтетазы (*NOS3*) известны 4 полиморфных варианта: A27C в интроне 18; G10T в интроне 23; 4a/4b полиморфизм в интроне 4 и структурный полиморфизм Glu298Asp в экзоне 7. Полиморфизм в интроне 4 представлен 2 аллелями: 4b-аллель, в котором присутствуют 5 повторяющихся фрагментов 27 п. н., и 4a-аллель, в котором 4 таких повтора. У гомозигот по аллелю 4a, уровень нитратов и нитритов в крови, который напрямую связан со скоростью выработки оксида азота эндотелием сосудов, достоверно ниже, чем у индивидов с генотипом 4b/4b. Это свидетельствует о влиянии данного полиморфизма на уровень экспрессии гена.

Выявлена ассоциация 4a/4b-полиморфизма гена *NOS3* с привычным невынашиванием беременности и задержкой внутриутробного развития плода [51, 258].

Частота аллеля 4a при привычной потере плода составляет 20% и оказывается достоверно выше ($p < 0,05$), чем в контроле (11%).

Таким образом, обобщая литературные данные, следует отметить, что изучение ассоциаций полиморфизма генов, обеспечивающих функ-

ции эндотелия, с риском развития привычной потери плода все еще находится в начале пути. Необходимо комплексное изучение полиморфизма сразу нескольких генов с одновременным учетом биохимической активности соответствующих ферментов.

6.6.2.5. Гены иммунной системы

В этиологии невынашивания беременности иммунологические факторы занимают одно из ведущих мест [143]. Известно, что одной из причин невынашивания беременности в первом триместре может быть иммунологический конфликт между зародышем и материнским организмом. Это может приводить к повторным выкидышам. У женщин с привычным невынашиванием беременности наблюдаются изменения как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [175, 190].

В последние годы активно изучается роль генов главного комплекса гистосовместимости человека (Human Leukocyte Antigen — HLA) в генезе привычного невынашивания беременности. Установлено, что несовместимость супругов по HLA-антигенам, а также несовместимость эмбриона и материнского организма по этой системе является важным моментом, необходимым для сохранения и вынашивания беременности. Несовпадение *HLA*-генотипов у супругов является благоприятным фактором для развития беременности. В супружеских парах с привычным невынашиванием беременности неясного генеза отмечено, что совпадения антигенов HLA класса II встречаются достоверно чаще по сравнению с теми парами, где беременность развивается нормально [327] (рис. 6.6.16).

Согласно некоторым данным, совместимость супругов по 2 и более антигенам HLA системы повышает риск невынашивания беременности почти до 100 % [189]. Совпадение HLA-антигенов у матери и плода в случае невынашивания беременности встречаются чаще по сравнению с теми, где беременность развивается нормально.

Ассоциации системы HLA с различной репродуктивной патологией в последние годы изучаются особенно интенсивно. Установлено, что 86,5 % пациенток с антифосфолипидным синдромом имеют антиген *HLA DQ4*, а при наличии аллеля *DQA 0201* у мужчин из пар с невынашиванием беременности — в 50 % случаев беременность заканчивалась анэмбрионией.

Многочисленные исследования показали, что *HLA*-генотипы *DRB1 03/-*; *DRB1 04/-*; *DQA1 0101/-*; *DQB1 0402/-*; *DQB1 0604/0605*; *DQB1 0501/0502* у матери являются факторами риска развития невына-

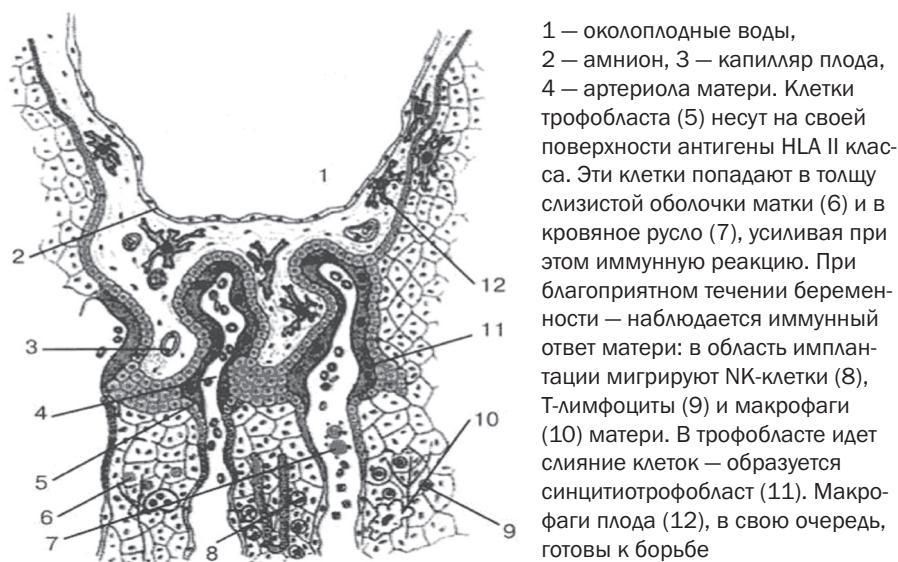


Рис. 6.6.16. Основные компоненты иммунных реакций при формировании плаценты

шивания беременности [238, 293, 689]. В наших исследованиях установлено повышение частоты совпадений по 2 локусам системы HLA II в группе супругов как с привычным невынашиванием беременности, так и с невынашиванием беременности по сравнению с контролем [49, 51]. Согласно коэффициенту соотношения шансов риск привычного невынашивания беременности у пар, совпадающих по двум локусам, повышен в 3,5 раза. Эти данные согласуются с результатами других наблюдений [189, 327].

Особый интерес вызывает серия работ, посвященных изучению полиморфизма гена *HLA-G* у женщин с привычным невынашиванием беременности. Установлено, что аллель 010103 гена *HLA-G* в 2 раза чаще встречался у женщин с 3 самопроизвольными выкидышами в анамнезе по сравнению с контролем [242]. В другой работе [302] выявлена ассоциация аллелей 0105N и 0104 гена *HLA-G* у женщин с 2 и особенно с 5 выкидышами в анамнезе. Достоверная ассоциация с привычным невынашиванием беременности отмечена и для 14-bp инсерционно-делеционного полиморфизма гена *HLA-G* [505].

Роль аллелей генов системы *HLA* II класса (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*) в патогенезе невынашивания беременности остается до конца невыясненной. Однако уже сейчас их можно рассматривать как фактор на-

следственного риска невынашивания беременности. Мы считаем целесообразным обследовать *HLA*-генотипы обоих супругов после двух самопроизвольных и даже после одного выкидыша в анамнезе. При выявлении совпадений у супругов по 2 и более локусам системы *HLA*, а также при наличии определенных генотипов, предрасполагающих к невынашиванию беременности, необходимо проведение соответствующего упредительного лечения. В частности, одним из профилактических методов является иммунизация таких женщин Т- и В-лимфоцитами супруга. Появление антител к *HLA*-антигенам мужа увеличивает шанс благоприятного исхода каждой последующей беременности и рождения доношенных детей.

6.6.2.6. Гены рецепторов половых гормонов

Известно, что при недостаточности функции яичников беременность обычно прерывается в I триместре [190]. При обследовании женщин с невынашиванием беременности в 44% случаев выявляется недостаточность гормонов лютеиновой фазы цикла [143]. В крови таких женщин уровень прогестерона и эстрогена обычно несколько снижен. Недостаточность гормонов нередко сопровождается нарушением фолликулогенеза. Следствием неполноценности фолликула является редуцированное желтое тело и недостаточная продукция прогестерона. Последнее приводит к нарушению секреторных преобразований эндометрия и рецепции половых гормонов: прогестерона и эстрогена. В результате десинхронизации развития эндометрия и яйцеклетки нарушается процесс имплантации и наступает спонтанное прерывание беременности. Патогенетические механизмы такой патологии (в том числе и невынашивания беременности) весьма гетерогенны. Генетические аспекты этой проблемы изучены недостаточно.

Аналізу ассоциации аллельного полиморфизма в гене рецептора прогестерона (*PGR*) с невынашиванием беременности посвящено несколько сообщений [465, 758]. Рецептор прогестерона опосредует физиологические эффекты гормона и существует в двух изоформах — PR-A и PR-B. PR-A препятствует клеточной пролиферации, индуцированной эстрогеном или прогестероном, тогда как PR-B потенцирует ее. Известны несколько основных мутаций гена рецептора прогестерона: полиморфизм 331G/A промоторной части, а также полиморфизм 1031G/C — в 1 экзоне, 1978 G/T — в 3 экзоне, 2310 C/T — в 5 экзоне, инсерция в интроне G (PROGINS).

Известно, что полиморфизм 331G/A гена *PGR* повышает экспрессию изоформы PR-B и ассоциирован с раком эндометрия и молочной железы. Показана ассоциация 331G/A-полиморфизма гена *PGR* с уровнем пролактина в крови у 270 женщин репродуктивного и перименопаузального периодов [676]. При этом отмечено значительное увеличение частоты трех мутантных аллелей *1031C*, *1978T*, *2310T* гена *PGR* у пациенток с привычным невынашиванием беременности ($p < 0,008$). Однако невынашивание беременности не обнаруживало корреляции с инсерционным полиморфизмом PROGINS гена *PGR* [758].

Достоверные различия частот аллеля *T2* полиморфизма PROGINS установлены у пациенток с отягощенным акушерским анамнезом (бесплодие, невынашивание беременности, эндометриоз) и у здоровых женщин. Показана достоверная ассоциация тяжелых форм эндометриоза и распространенности опухолевого процесса у пациенток с генотипом *T2/T2* (см. раздел 6.6.2.1) [458].

Отмечено повышение частоты аллеля *T* и генотипа *C/T* и *T/T* полиморфизма IVS1–401C/T гена рецептора эстрогена- α у женщин с единственным выкидышем позднего срока в анамнезе [465].

Суммируя, можно отметить, что изучение возможных ассоциаций акушерской патологии (невынашивание беременности, привычное невынашивание беременности) с полиморфизмом генов половых гормонов и их рецепторов начато сравнительно недавно. Нет, однако, сомнения, что почти 50% случаев невынашивания беременности являются результатом эндокринных нарушений. Поэтому продолжение таких исследований, особенно у женщин с привычным невынашиванием беременности, очень актуально.

6.6.2.7. Гены факторов роста хориона и плаценты

К настоящему времени известно, что в организме человека существует единая интегрирующая система факторов роста, играющая важную роль в процессах роста и дифференцировки, межклеточной кооперации, гемопоэзе, ангиогенезе и пр. [373, 440]. Успешная имплантация оплодотворенной яйцеклетки, становление и развитие плаценты и всего сложного комплекса мать–плацента–плод возможны только в результате деятельности хорошо скоординированной системы клеточных реакций, регулируемых локальными медиаторами — цитокинами и стероидными гормонами (см. 6.6.3).

Плацентация инициируется взаимодействием цитотрофобласта с децидуальной тканью эндометрия. Начиная с 2–3 недель беременности трофобласт инвазирует стенки капилляров, артериол и мелких спиральных артерий. К 8–10 неделе инвазия трофобласта распространяется на эндометриальные сегменты спиральных артерий. Характер паракринных взаимоотношений между трофобластом и эндометрием определяется локальной активностью гормонов и факторов роста [775]. Так, степень децидуальных изменений в эндометрии зависит от уровня эстрогенов и инсулиноподобных факторов роста. Проллиферативная активность клеток трофобласта контролируется прогестероном и тканевыми факторами роста.

Нарушения формирования полноценной сосудистой системы хориона являются важными факторами патогенеза, таких частых акушерских патологий, как гестоз (см. 6.3), плацентарная недостаточность и невынашивание беременности [535, 554]. В пролиферации клеточных компонентов эндотелия сосудов основная роль отводится факторам роста: васкулярно-эндотелиальному фактору, трансформирующему фактору, инсулиноподобному фактору, фактору некроза опухоли и т. д. [522, 646].

Исследования полиморфизма генов факторов роста как возможных причин невынашивания беременности только начинаются.

В гене васкулярно-эндотелиального фактора роста (*VEGF*) известны 4 полиморфных сайта: 2578 C/A, 1154 G/A, 634 G/C, 936 C/T. Полиморфизм 1154 G/A гена *VEGF* представлен 2 аллелями: *G* — нормальный и *A* — мутантный. У гомозигот *A/A* уровень *VEGF* в крови достоверно ниже, чем у индивидов с генотипом *G/G*, что свидетельствует о влиянии данного полиморфизма на экспрессию гена *VEGF* [482].

Известно, что при невынашивании беременности уровень факторов роста в крови матери снижен. Так, у женщин с начавшимся самопроизвольным выкидышем и/или с замершей беременностью в I триместре концентрация *VEGF* в сыворотке крови снижается в 2 раза, а уровень инсулиноподобного фактора роста 1 — более чем в 4 раза выше, чем при нормальной беременности [118, 151].

Частота аллеля *1154A* гена *VEGF* у женщин с тремя и более самопроизвольными выкидышами в анамнезе достоверно выше, чем в группе контроля [790]. Установлена также ассоциация полиморфизма 936 C/T гена *VEGF* с риском развития привычного невынашивания беременности. Так, у пациенток с привычной потерей плода генотипы *C/T* и *T/T* встречаются в 1,5 раза чаще, чем в норме.

Таким образом, снижение или дисбаланс локальных (тканевых) факторов роста у женщин с невынашиванием беременности может быть генетически обусловленным. Изучение полиморфизма и особенностей экспрессии генов факторов роста хориона и плаценты важно для разработки диагностических тестов, досимптоматической диагностики и прогнозирования невынашивания беременности, что в дальнейшем позволит разработать новую патогенетическую терапию невынашивания беременности.

Заключение

Открытые в последние 10–15 лет генетические факторы (генные сети), контролирующие такие важные метаболические процессы, как свертывание крови, детоксикацию, фолатный цикл, гормональный и иммунологический гомеостаз и др., при определенных условиях могут выступать в качестве ведущих причин такой тяжелой акушерской патологии, как невынашивание беременности.

В итоге многолетних исследований нами разработан алгоритм генетического обследования супругов с невынашиванием беременности в анамнезе, который включает 3 последовательные этапа (рис. 6.6.17).

1-й этап: отбор супружеских пар (групп риска) с разными формами невынашивания беременности. К ним относят пары как с двумя, тремя и более выкидышами (привычное невынашивание беременности), так и с одним самопроизвольным выкидышем в анамнезе.

2-й этап: консультация отобранных пациенток врачом акушером-гинекологом, имеющим специализацию по медицинской генетике, или врачом-генетиком с опытом работы в акушерской клинике; назначение супругам цитогенетического и молекулярно-генетического обследования для исключения или подтверждения патологии кариотипа или наличия неблагоприятных аллельных вариантов генов предрасположенности к невынашиванию беременности (индивидуальный набор генов для каждой пары).

3-й этап: повторная консультация супругов с расшифровкой и интерпретацией данных генетического обследования. Рекомендации по лечению и профилактике невынашивания беременности, ведение беременной совместно с другими специалистами — иммунологами, гематологами, эндокринологами.

Обследование пациентов желательно проводить до планируемой беременности или при наличии беременности до 12–16 недель; исходя

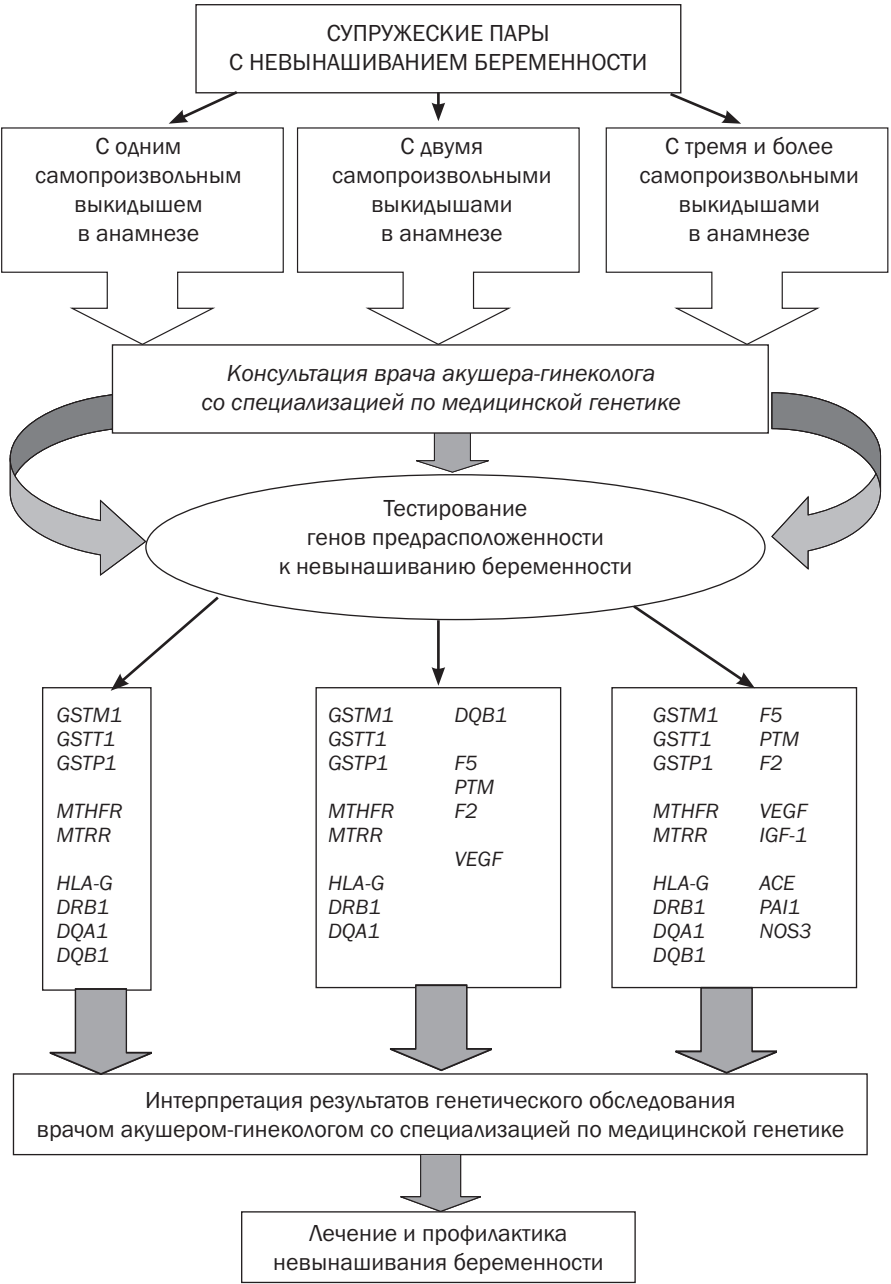


Рис. 6.6.17. Алгоритм генетического обследования семей высокого риска по невынашиванию беременности

из особенностей анамнеза, целесообразно назначать тестирование генетических систем — наиболее вероятных кандидатов наследственной предрасположенности к невынашиванию беременности.

Тестирование генов наследственной предрасположенности к невынашиванию беременности возможно и у женщин, планирующих первую беременность. В случае высокой генетической вероятности любой акушерской патологии ее манифестация может быть отсрочена или полностью предотвращена еще в досимптоматический период с помощью соответствующих методов профилактики.

Уместно отметить, однако, что все рассмотренные данные о наследственных факторах невынашивания беременности касались лишь результатов ретроспективных исследований. Между тем следует напомнить, что практическая значимость таких работ может быть доказана только в условиях **проспективного генетического тестирования**, то есть в исследованиях, где не только идентифицируются причины наследственного риска невынашивания беременности, но и предлагаются эффективные способы ее профилактики. Такие исследования в настоящее время активно проводятся.

6.6.3. Гестоз

Введение

Гестоз (Г) представляет собой возникающий при беременности синдром полиорганной недостаточности, в основе которого лежит увеличение проницаемости сосудистой стенки и других мембран и связанные с этим волевические и гемодинамические нарушения [98]. Г занимает лидирующие позиции в патологии беременности и остается одной из наиболее актуальных проблем современного акушерства. Г встречается у 6–8 % беременных развитых стран. В развивающихся странах Г диагностируется у 20 % беременных и в 40 % случаев является причиной материнской смерти. На долю Г приходится до 70 % мертворождений и выкидышей [821], а величина перинатальных потерь при Г возрастает почти в 5 раз [427]. В России Г встречается примерно у 11–16 % беременных и занимает 3-е место среди причин материнской смертности [185]. Высокая частота материнской и перинатальной заболеваемости и смертности объясняется отсутствием точных сведений о патогенезе Г, достоверных лабораторных методов диагностики и, как следствие этого, действенных мер профилактики и лечения.

Существуют многочисленные наблюдения, свидетельствующие о важной роли наследственного компонента в этиологии и патогенезе Г. Еще в 1960 году были опубликованы данные по систематическому исследованию Г, осложненного гипертензией, в парах «мать–дочь». Было показано, что 28 % дочерей, родившихся от матерей с Г, также имели Г при беременности [501]. Повышенная частота Г зарегистрирована у сестер, дочерей и даже внуков тех женщин, которые ранее сами болели Г [352]. Более того, если оба родителя родились от осложненной Г беременности, вероятность Г у их дочерей достоверно возрастает по сравнению с контрольной группой [650]. Согласно некоторым наблюдениям, наследственная предрасположенность к Г передается как по женской, так и по мужской линии [442].

Таким образом, по существующим представлениям Г является типичным мультифакториальным заболеванием, в генезе которого важная роль принадлежит как генетическому компоненту, так и различным неблагоприятным экзогенным факторам, провоцирующим данное заболевание.

6.6.3.1. Современные представления о патогенезе

Несмотря на многочисленные исследования, вопросы этиологии и патогенеза Г все еще далеки от окончательного разрешения. Вместе с тем они свидетельствуют о полиэтиологичности данного заболевания, что позволяет рассматривать его не как самостоятельную болезнь, а как синдром нарушений, возникающих в результате адаптационного ответа организма матери на самые разные воздействия, приводящие к кислородной недостаточности у плода. При наличии достаточно четкой клинической картины заболевания до сих пор нет удобного скринирующего теста или эффективного способа лечения гестоза.

Патофизиологическую основу гестоза составляют гемодинамические расстройства маточно-плацентарного кровообращения, тромбофилия, оксидативный стресс и нарушения иммунологических взаимоотношений между организмами плода и матери. Подробно эти механизмы рассмотрены в многочисленных обзорах, методических рекомендациях и монографиях [21, 185, 607].

Предполагаемые патогенетические механизмы возникновения и развития гестоза представлены на рисунке 6.6.18.

Согласно современным представлениям, гестоз инициируется уже на ранних стадиях эмбриогенеза и является следствием нарушений процессов плацентации. Прежде всего это относится к нарушениям



Рис. 6.6.18. Основные патогенетические механизмы гестоза [351]

формирования фетоплацентарной сети в результате **задержки трансформации цитотрофобласта** в эндотелий-подобные клетки, обладающие инвазивными свойствами (процесс «псевдоваскулогенеза»), и **задержки преобразования спиральных маточных артерий** в расширенные лакуны, в просвет которых должны вращать ворсинки хориона (**формирование маточно-плацентарного кровотока**), что в конечном счете ведет к ишемии плаценты (рис. 6.6.19).

Наиболее интригующим в настоящее время остается вопрос о том, какие из этих нарушений являются первичными. Происходят ли они вследствие генетической неполноценности клеток плода или

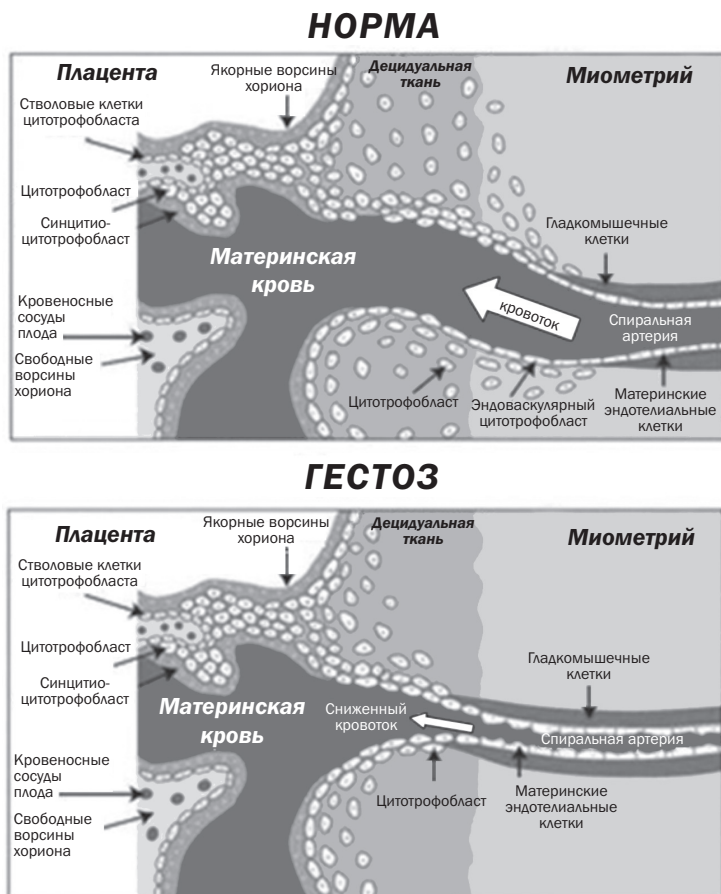


Рис. 6.6.19. Аномальная плацентация при гестозе [325]

нарушений имплантации и плацентации, возникающих по различным причинам, являются ли основным триггером всей цепи патофизиологических процессов, типичных для гестоза, остается не ясным. Согласно многолетним исследованиям патогенеза гестоза группой С. Фишер [427], именно нарушение васкуляризации в процессе имплантации и плацентации является основным и первичным звеном патогенеза заболевания. В соответствии с хорошо обоснованной гипотезой исследовательской группы из Гарвардского университета (США), нарушения плацентации возникают вторично и являются следствием ошибок экспрессии генов, ответственных за процессы

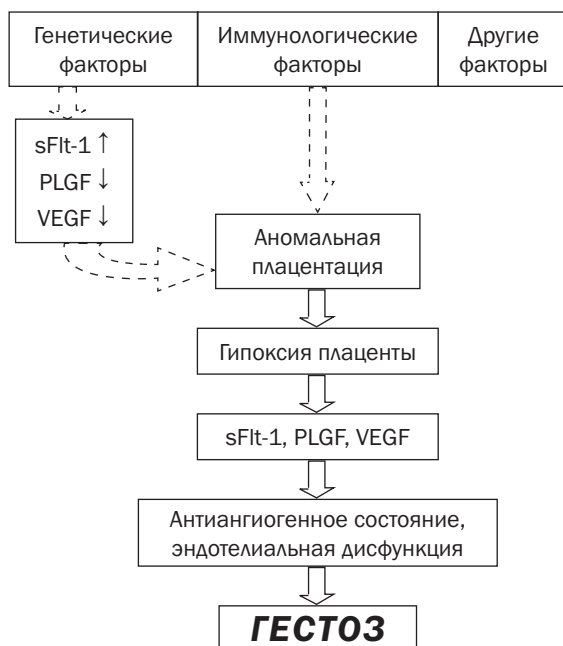


Рис. 6.6.20. Аномальная плацентация при гестозе [325]

васкуляризации имплантирующейся яйцеклетки (VEGF — эндотелиальный ростовой фактор сосудов) и плаценты (PLGF — плацентарный ростовой фактор), а также их рецепторов (VEGFR) [325]. Решающая роль при этом отводится антиангиогенному фактору sFlt1 — aberrantному продукту сплайсинга гена *VEGFR*, который, присутствуя в сыворотке крови матери, нейтрализует и вызывает дефицит факторов нормального ангиогенеза плаценты VEGF и PLGF. Как показано на рисунке 6.6.20, следствием блока ангиогенеза являются аномальная плацентация, гипоксия, дальнейшее угнетение экспрессии генов ангиогенеза, а также эндотелиальная дисфункция, при прогрессировании которой развивается клиническая картина гестоза. Есть основания считать, что полногеномный анализ экспрессии генов плаценты на разных стадиях эмбриогенеза в норме и при гестозе позволит оценить реальность этой интересной гипотезы [438].

Данная гипотеза отнюдь не отрицает того, что нарушения ангиогенеза в плаценте могут вызываться не только ошибками сплайсинга гена *VEGFR*, но и провоцироваться многими другими повреждающими факторами как эндогенной, так и экзогенной природы.

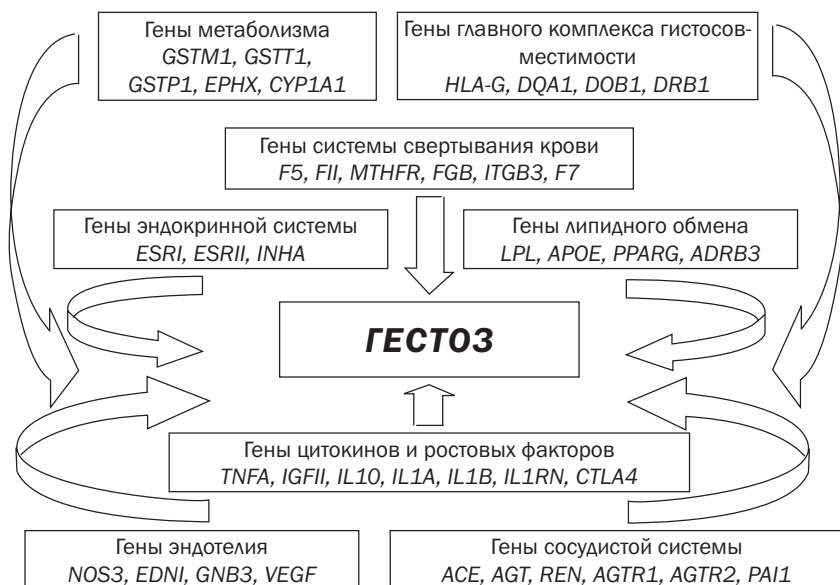


Рис. 6.6.21. Локальные и интегральные генные сети при гестозе

6.6.3.2. Генная сеть

Принимая во внимание сложность и многообразие патофизиологических процессов, определяющих развитие клинического симптомокомплекса при Г (см. рис. 6.6.18), и противоречивость результатов исследований, объективно смоделировать всю генную сеть Г пока не представляется возможным. Однако уже сейчас, суммируя многочисленные данные по изучению генов предрасположенности к данному заболеванию, их можно сгруппировать в несколько самостоятельных, но функционально тесно взаимосвязанных локальных генных сетей (рис. 6.6.21).

В настоящее время, по мировым данным, исследовано свыше 20 генов предрасположенности к развитию Г. Полученные в этих работах результаты зачастую противоречивы и требуют уточнения на большем клиническом материале с использованием современных методов статистического анализа (см. главу 8).

Ниже рассмотрены наиболее значимые гены, для аллельных вариантов которых уже показана ассоциация с развитием Г.

6.6.3.2.1. Гены главного комплекса гистосовместимости

Как уже отмечалось (см. 6.3.1), нарушения инвазивных свойств клеток трофобласта играют важную роль в патогенезе Г. Хорошо извест-

тно, что фетоплацентарный комплекс является своего рода аллотрансплантантом и представляет собой уникальный пример иммунологической «толерантности» [362]. Доказана важная роль HLA-антигенов клеток трофобласта в становлении иммуносупрессорного статуса у матери, при нарушении которого возникает опасность отторжения плода. Следовательно, экспрессия генов *HLA*-локуса определяет степень инвазии трофобласта в слизистую оболочку матки и, таким образом, тесно связана с процессами васкуляризации при имплантации и плацентации зародыша [472]. Считается, что Г развивается в результате не усиленного, а ослабленного распознавания клетками матери антигенов плода и недостаточной, вследствие этого, продукции иммунных супрессорных факторов [729].

Известно, что трофобласт несет на себе HLA-антигены как отцовского, так и материнского происхождения. Генетическая составляющая гестоза предполагает участие в нем как материнских, так и фетальных/отцовских генов [580]. Из всех «классических» HLA-антигенов наиболее четкая ассоциация с Г отмечена в отношении **антигена II типа HLA-DR4** [540, 574]. Кроме того, выявлена его возможная связь с антигенами DR5 и A30 [510]. Однако некоторые исследователи отрицают наличие ассоциации HLA-DR-антигенов с гестозом [805]. Особый интерес вызывает работа венесуэльских ученых по определению аллелей и гаплотипов *HLA*-генов I (*HLA-A* и *HLA-G*) и II класса (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*), а также детекции последовательностей цитомегаловируса HCMV у 26 женщин с гестозом, 29 женщин контрольной группы и их детей. Согласно полученным результатам, факторами риска развития гестоза являются наличие материнского HLA-гаплотипа *G*0104 — DRB1*07/*06 — DQA1*0201 — DQB1*0201*, гаплотипа плода *G*0104 — A*24 — DRB1*07 — DQA1*0201 — DQB1*0201*, наследование материнской аллели *G*0104* и наличие специфических последовательностей HCMV. При этом у носителей аллеля *DRB1*06* или *DRB1*07* наличие последовательностей HCMV существенно увеличивает риск развития Г [349].

Пристальное внимание исследователей привлекают неклассические HLA-антигены, которые экспрессируются преимущественно клетками трофобласта: HLA-C, HLA-E и HLA-G. В частности, HLA-G может защищать клетки трофобласта от лизиса, опосредованного NK-клетками [700], и, таким образом, способствует установлению толерантности между матерью и плодом. Показано, что при наличии

гестоза в 90% плацент экспрессия *HLA-G* отсутствовала или была значительно снижена по сравнению с нормальной беременностью [557]. Ген *HLA-G* характеризуется низкой частотой полиморфных сайтов. Обнаруженный в 1993 году полиморфизм гена *HLA-G* представляет собой инсерцию/делецию 14 п. н. (+14 п. н. / -14 п. н.) в 3'-нетранслируемой области гена [483]. Этот полиморфизм стал одним из наиболее перспективных иммуногенетических маркеров гестоза. Присутствие аллеля +14 п. н. гена *HLA-G* приводит к снижению уровня мРНК вследствие альтернативного сплайсинга первичного продукта (мРНК гена *HLA-G*) и обнаруживает положительную ассоциацию с гестозом [504].

Большой интерес для выяснения ассоциации генов гистосовместимости с гестозом представляет генотипирование не только материнских *HLA*-генов, но и соответствующих аллельных вариантов этих генов отцовского и фетального происхождения. В связи с очевидными организационными сложностями такие исследования пока единичны. Опубликованы только несколько работ, в которых проведено исследование пары мать–ребенок или всей триады, включающей в себя обоих родителей и ребенка [349]. При анализе триад по гену *HLA-G* выявлено, что частота детей, гомозиготных по аллелю +14, достоверно выше ($p = 0,002$) среди родившихся от осложненной гестозом первой беременности (30%), чем в триадах без гестоза (7,1%) [506]. В этой же работе показано предпочтительное наследование аллеля +14 отцовского происхождения в группе с Г по сравнению с контролем ($p = 0,006$).

Таким образом, определенные аллели генов *HLA* локуса антигенов I и II типов (*HLA-DR4*, *HLA-G*, *DRB1*) обнаруживают достоверную ассоциацию с Г. Перспективны дальнейшие исследования по поиску генов предрасположенности к гестозу среди генов суперсемейства *HLA*.

6.6.3.2.2. Гены цитокинов и ростовых факторов

Имплантация и плацентация — результат сложных взаимодействий цитокинов, регуляторов транскрипции и ростовых факторов как зародышевого, так и материнского происхождения. В плаценте идентифицированы несколько ростовых факторов и цитокинов, такие как VEGF (эндотелиальный фактор роста сосудов), TNF- α (фактор некроза опухоли альфа) и TGF- β (трансформирующий фактор роста фибробластов). Эти факторы регулируют пролиферацию и дифференциацию клеток трофобласта на различных сроках беременности. Результаты анализа экспрессии более 220 генов в плацентах при нормально про-

текающей беременности и при Г показали, что для 22 генов интерлейкинов и их рецепторов, 15 генов суперсемейства TNF и почти 55 генов других цитокинов и их рецепторов выявлено достоверное повышение экспрессии в плацентах от осложненной Г беременности [647].

При анализе частот аллельных вариантов C850T гена *TNFA* выявлено, что частота мутантного аллеля *T* достоверно снижена в группе больных с Г (4,5%) по сравнению с контролем (9,6%) ($p = 0,03$). Высказано предположение о протективным эффекте данного аллеля в отношении развития Г [670]. Показана также ассоциация другого аллельного варианта этого гена $-308G > A$ с тяжелой ($p = 0,025$), но не с легкой формой Г ($p > 0,05$) [529].

При генотипировании пациентов из Греции по аллельным вариантам $-2758A/C$, $-634G/C$ и $936C/T$ гена эндотелиального фактора роста сосудов (*VEGF*) достоверная связь с тяжелой формой гестоза показана лишь для аллеля 936T ($OR = 2,70$; $CI: 1,09-6,63$; $p = 0,019$) [791]. В то же время в европеоидной популяции Бразилии частоты тех же аллельных вариантов не отличались между пациентами с гестозом и контрольной группой, однако было выявлено достоверное снижение частот генотипа $-1082G/G$ по гену *IL10* у больных (5%) по сравнению со здоровыми беременными женщинами (15%, $p = 0,02$) [380]. В детальном исследовании полиморфизма $1082G > A$ гена *IL10* у беременных из Австралии установлено: (1) уровень плацентарной мРНК этого гена при гестозе достоверно снижен ($p = 0,015$) у пациенток, гомозиготных по аллелю *A* ($p = 0,026$); (2) имеется положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *IL10* и весом ребенка при рождении ($r = 0,25$, $p = 0,001$); (3) имеется отрицательная корреляция между уровнем IL-10 в плаценте и значениями систолического ($r = -0,15$, $p = 0,013$) и диастолического ($r = -0,21$, $p = 0,003$) артериального давления у матери [661].

Несмотря на очевидную патогенетическую обоснованность изучения полиморфизма генов цитокинов и ростовых факторов при Г, такие исследования все еще весьма немногочисленны. В свете гипотезы первичного нарушения экспрессии генов ростовых факторов [325] необходимость дальнейшего углубленного изучения полиморфных маркеров этих генов при Г представляется особенно очевидной.

6.6.3.2.3. Гены метаболизма

Одним из важных патогенетических факторов Г считается повреждающее действие свободных радикалов на клетки и ткани эндотелия —

оксидативный стресс [383]. Развитие оксидативного стресса в значительной мере определяется функциональной активностью генов метаболизма (см. рис. 6.3.1), продукты которых обеспечивают две функционально сцепленные фазы метаболизма ксенобиотиков и эндогенных токсинов — фаза I активации и фаза II детоксикации (см. главу V). Гены, кодирующие ферменты обеих фаз, характеризуются значительным полиморфизмом, приводящим к появлению энзимов с различной активностью.

К ферментам фазы I относится микросомальная эпоксидгидролаза, катализирующая гидролиз эпоксидных соединений. Первый из двух наиболее значимых аллельных вариантов гена *EPHX1* представляет собой замену цитозина на тимин в 3 экзоне гена, приводящую к аминокислотной замене тирозина на гистидин в 113 положении белка (Tyr113His). В опытах *in vitro* показано, что наличие аллеля *His113* коррелирует со снижением на 40 % энзиматической активности EPHX1 [484]. Второй аллельный вариант — это однонуклеотидная замена в 4 экзоне, приводящая к замене гистидина на аргинин в 139 положении полипептида (His139Arg), при этом аллель *His139* связан с 25%-м повышением активности фермента [484]. Показано достоверное увеличение частоты «быстрого» генотипа (*Tyr113/Tyr113*, экзон 3) по гену *EPHX1* у больных с Г (29 %) по сравнению с контрольной группой (16 %, $p = 0,007$) [234]. В финской популяции частота «быстрого» гаплотипа *Tyr113-His139* достоверно выше у пациенток с Г ($p = 0,01$) [779]. Эти наблюдения согласуются с результатами исследования энзиматической активности EPHX1 при разных гаплотипах по обоим вышеупомянутым вариантам полиморфизма гена *EPHX1* [496].

Важная роль в эмбриональном развитии принадлежит ферменту фазы II детоксикации плацентарной глутатион-S-трансферазе — продукту гена *GSTP1*. Установлено, что при Г содержание этого фермента снижено в плаценте и в децидуальной ткани [607]. Полиморфизм гена *GSTP1* обусловлен заменой нуклеотидов в положениях 313 или 341, что приводит к появлению 3 функционально различных форм фермента GSTP1 *a, *b, *c. Обе мутантные формы (*b и *c) функционально менее активны, особенно у гомозигот по соответствующим аллелям. Имеются данные о связи генотипа *Ib/Ib GSTP1* с гестозом. В наших исследованиях установлено, что аллельные частоты и частоты мутантных генотипов обнаруживают достоверную ассоциацию с некоторыми показателями тяжести заболевания, в частности с повышенной агрегацией тромбоцитов [607].

6.6.3.2.4. Гены системы свертывания крови

При тяжелых формах гестоза распространенными осложнениями являются различные нарушения свертывания крови, прежде всего тромбофилия. Существуют многочисленные исследования по выявлению мутаций в генах свертывания крови, ассоциированных с гестозом.

Как известно, точечная мутация *G1691A (R506Q)* в **факторе V свертывания крови (Лейденовская мутация)**, частота которой составляет 4–5% в европейских популяциях, является одной из наиболее важных причин развития генетически обусловленной тромбофилии [705]. Данные о связи этой мутации с гестозом противоречивы. Так, в исследованиях американских авторов отмечено только некоторое, статистически недостоверное, повышение частоты мутации у больных с гестозом по сравнению с контролем (7,2 и 4,5% соответственно) [420]. В других — частота Лейденовской мутации у больных с тяжелым Г составила 26,5% и более чем в 4 раза превысила таковую в контрольной группе (6%, $p < 0,001$) [516]. Сходная тенденция отмечена и в работе итальянских исследователей, в которой частота мутантного аллеля *1691A* оказалась также достоверно выше у больных гестозом (10,4%), чем в контроле (2,3%, $p = 0,01$) [422]. Повышенная частота аллеля *A* у больных с Г (18,3%) по сравнению со здоровыми женщинами (3,0%, $p < 0,001$) подтверждена венгерскими авторами [584], тогда как во многих других публикациях из разных стран (Чехия, Турция, Италия, Шотландия, Великобритания, Нидерланды, Ливан) ассоциации Лейденовской мутации с Г не выявлено.

Для другого полиморфизма гена *F5* — замены *G1628A (R485K)* была продемонстрирована ассоциация с тяжелой формой гестоза в японской популяции ($p = 0,02$) [279]. Достоверное увеличение частоты аллеля *A* ($p = 0,003$) и генотипа *A/A* ($p = 0,03$) по данному полиморфизму было выявлено у больных с Г в финской популяции [735].

Тромбофилические осложнения могут быть также обусловлены наличием мутации *G20210A* в **гене протромбина** (фактор II). Эта мутация приводит к повышенному синтезу протромбина и увеличению риска тромбоза. Ее популяционная частота в среднем составляет около 1%. В исследовании итальянских авторов показана ассоциация аллеля *A20210* с развитием Г [420]. Различия между сравниваемыми группами достоверны ($p < 0,041$). Авторами отмечается, что связь аллеля *A20210* с Г весьма примечательна, так как нарушенная инвазия трофобластом спиральных артерий и системное повреждение эндотелия являются важнейшими патогенетическими механизмами Г. По мнению авторов,

вполне логично, что мутация, предрасполагающая к развитию артериального тромбоза, является фактором риска развития Г.

Важным фактором развития тромбофилических осложнений при беременности является **гипергомоцистемия**, развитие которой может быть результатом полиморфизма в гене **метилентетрагидрофолатредуктазы** (*MTHFR*), приводящего к замене цитозина на тимин в 677 положении гена (*C677T*) [227]. У лиц, гомозиготных по аллелю *T*, отмечается 70%-е снижение активности *MTHFR* по сравнению с носителями генотипа *C/C*. В упоминавшейся работе исследователей из Массачусетса генотип *T/T* по гену *MTHFR* был достоверно ассоциирован с развитием тяжелого Г ($OR = 2,9$; $CI: 1,0-8,5$, $p = 0,04$) [516]. Аналогичные результаты были получены итальянскими авторами [422]. В японской популяции эти различия оказались еще более выраженными ($p = 0,004$) [596].

Однако в работах, выполненных на других популяциях и другими авторами (африканской (ЮАР, Зимбабве), австралийской белой, японской, турецкой, венгерской, английской, шотландской, финской, мексиканской, перуанской, бразильской) ассоциации аллельных вариантов *C677T* гена *MTHFR* с Г выявлено не было. В экспериментальном исследовании голландских ученых не удалось подтвердить связь генотипа *T/T* *MTHFR* с Г. Однако проведенный этими же авторами мета-анализ (обобщенный анализ литературных данных) показал наличие ассоциации аллельных вариантов *C677T* с заболеванием в голландской популяции ($OR = 2,0$; $CI: 1,4-2,9$) [597].

В результате мета-анализа 47 статей, посвященных изучению ассоциации с Г Лейденовской мутации гена *F5*, аллельных вариантов *C677T* гена *MTHFR* и *G20210A* гена *FII*, достоверная ассоциация с развитием Г ($OR = 1,81$; $CI: 1,14-2,87$) и тяжелого Г ($OR = 2,24$; $CI: 1,28-3,94$) была обнаружена только для аллеля *1691A* гена *F5* [569].

Особый интерес представляют работы, в которых объединяются исследования, проведенные в разных центрах по изучению Г в рамках одной страны, поскольку при таком подходе удастся проанализировать значительно больший объем выборки и дать статистически более обоснованную интерпретацию результатов генетического тестирования этнически родственных индивидов. Проведенный поиск литературы позволил обнаружить две такие работы.

В первой из них [768] был проведен сравнительный анализ частот вышеупомянутых аллельных вариантов тромбофилических генов в

группах с легкой и тяжелой формами Г с контрольной группой женщин. Работа выполнена на 1 600 образцах ДНК (800 больных и 800 контроля). Для больных с тяжелым Г установлено достоверное увеличение частоты Лейденовской мутации по гену *F5* (16,7%, $p = 0,000001$), гетерозиготного носительства аллеля 20210A гена *FII* (10,8%, $p = 0,000001$) и генотипа *T/T* по гену *MTHFR* (12,1%, $p = 0,00004$) по сравнению с контролем (3,7, 2,0 и 3,2% соответственно). Кроме того, была показана достоверная ассоциация аллельных вариантов генов *FII* ($OR = 3,3$; $CI: 1,1-10,3$) и *MTHFR* ($OR = 2,6$; $CI: 2,3-5,5$) с легкой формой Г. При этом уровень значимости частотных различий соответствующих аллелей при легких формах Г в сравнении с контролем оказался значительно меньше ($p = 0,03$ и $p = 0,007$ соответственно), чем при тяжелой форме этой патологии.

Во втором масштабном исследовании более 10 центров Великобритании — GOPEC study (Genetic Of Pre-EClampsia) применялся метод анализа неслучайной передачи аллеля от гетерозиготных родителей потомкам (TDT-test). В работе обследовано 657 женщин с Г и их семей. Среди других генов в отчете публикуются данные по аллельным вариантам генов *MTHFR* и *F5* и делается вывод об отсутствии вклада этих генов в развитие Г [391]. Однако в этой работе не указано, проводилось ли разделение групп больных на подгруппы по степени тяжести заболевания.

Одним из важнейших генов гемостаза является **ген ингибитора активатора плазминогена типа I** (*PAII*) белковый продукт которого, ингибитор тканевого активатора плазминогена тип 1 (ИТАП-1), принимает непосредственное участие в плазменном звене гемостаза. Число работ, в которых показана ассоциация между аллельными вариантами гена и Г, с каждым годом увеличивается.

В работе японских авторов при обследовании более 600 человек обнаружена связь генотипа *4G/4G* и аллеля *4G* гена *PAII* с развитием тяжелого Г ($p = 0,04$ и $p = 0,03$, соответственно) [739].

Необычные результаты были получены в работе группы немецких авторов [749]. Они показали, что наличие протективного в отношении Г *5G/5G*-генотипа способствует более раннему развитию заболевания по сравнению с предрасполагающему к Г аллелю *4G* (в среднем на 26-й и 30-й неделях беременности соответственно, $p = 0,024$).

Результаты мета-анализа данных по 880 пациентам и 810 контрольным образцам по 6 публикациям свидетельствовали о том, что среди носителей аллеля *4G* гена *PAII* вероятность развития Г (54,9% случаев) достоверно выше, чем при его отсутствии (43,1%, $p < 0,05$) [806].

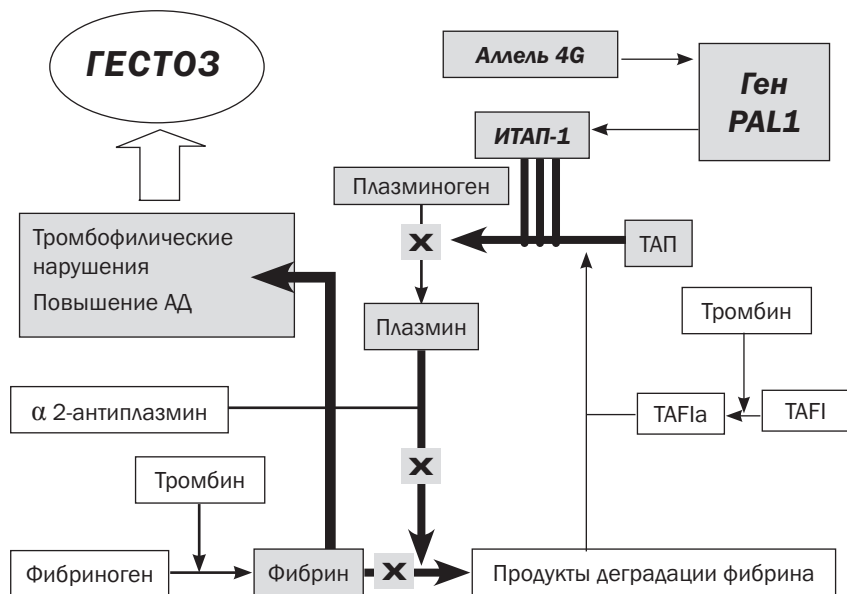


Рис. 6.6.22. Гипотетическая схема влияния аллеля 4G гена *PAII* на развитие гестоза (пояснения в тексте)

Интересно отметить, что частоты аллелей и генотипов по данному полиморфизму значительно варьируют в различных этнических группах. Например, у больных с Г из Южной Африки, где не было выявлено ассоциации этого полиморфного маркера с заболеванием, популяционная частота аллеля *4G* составила всего 15%, а генотип *4G/4G* зарегистрирован менее чем у 2% населения [651]. Наряду с этим в европейских и американских популяциях эти частоты оказались значительно выше (40–60% для аллеля *4G* и 15–20% для генотипа *4G/4G*) [298, 463].

Частота аллеля 4G у больных гестозом в Северо-Западном регионе России достоверно выше (71,1 %) по сравнению с контрольной группой (57,5%, $p = 0,04$) [607]. Схема возможного развития гестоза при наличии функционально неблагоприятного аллеля 4G гена *PAII* приведена на рисунке 6.6.22.

Таким образом, несмотря на противоречивые данные разных авторов, связанные, прежде всего, с существенными популяционными различиями аллельных частот исследованных генов, размером выборки и клиническими особенностями Г у обследованных больных, складывается впечатление, что для ряда европейских популяций аллельные

варианты всех выше рассмотренных генов тромбофилии вносят значительный вклад в развитие тяжелых форм гестоза.

6.6.3.2.5. Гены сосудистой системы

Практически самым важным диагностическим признаком Г является повышение артериального давления (гипертензия). Изучение полиморфизма генов, продукты которых участвуют в регуляции артериального давления, является наиболее активно развивающимся направлением в области медицинской молекулярной генетики. Множество исследований посвящено аллельным вариантам генов сосудистой системы, в том числе и в связи с развитием Г.

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) хорошо известен как фермент, регулирующий кровяное давление. Его ведущая роль в регуляции артериального давления подтверждается широким и успешным применением ингибиторов АПФ в клинике для лечения гипертензивных состояний различного происхождения, связанных с нарушениями кровообращения, заболеваний сердечно-сосудистой системы. Эти препараты широко используются при лечении нефропатии.

Ген *ACE*, кодирующий данный фермент, картирован на хромосоме 17q23. В интроне 16 гена *ACE* присутствует (Insertion — I) либо отсутствует (Deletion — D) Alu-повтор, состоящий из 287 пар оснований [259]. Показано, что уровень АПФ в сыворотке у людей, гомозиготных по *D*-аллелю, почти в 2 раза выше, чем у гомозигот по *I* аллелю и имеет среднее значение у *I/D*-гетерозигот [259]. *D*-аллель гена *ACE* рассматривают как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркт миокарда, спазм коронарных сосудов, гипертрофия левого желудочка, ишемическая болезнь сердца), а также связывают с высоким риском развития атеросклероза.

Ассоциации полиморфизма гена *ACE* с развитием Г посвящено лишь несколько публикаций. В работе китайских авторов показано значительное увеличение частоты аллеля *D* и генотипа *D/D* у пациенток с Г [386]. Однако в другой работе не было обнаружено какой-либо связи аллелей инсерционно-делеционного полиморфизма гена *ACE* с Г [395]. Интерес представляет статья итальянских авторов, в которой выявлены достоверные различия частот аллеля *D* у больных Г и замедленным ростом плода и у беременных без этих осложнений. При этом частоты генотипа *D/D* и аллеля *D* гена *ACE* были достоверно выше в группе больных Г ($p = 0,0002$ и $p < 0,0001$ соответственно).

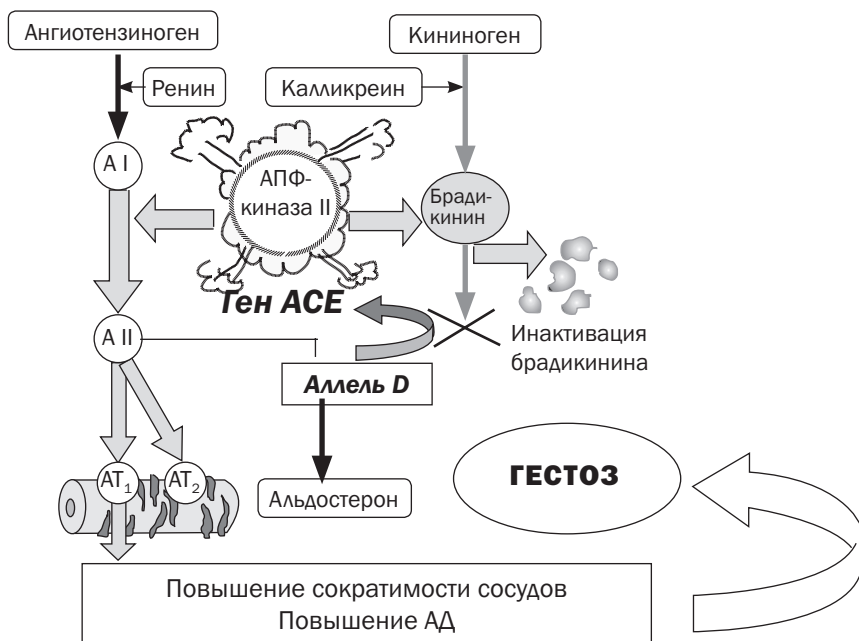


Рис. 6.6.23. Гипотетическая схема влияния аллеля *D* гена *ACE* на развитие гестоза (пояснения в тексте)

Кроме того, показана достоверная ассоциация Γ и замедленного роста плода с наличием генотипа *D/D* ($p = 0,0007$) [585]. В популяции Северо-Западного региона России нами также было отмечено повышение частоты гомозигот *D* у больных с легким Γ (55,8%) в сравнении с контролем (38,3%). Однако эти различия не были статистически значимыми ($p = 0,09$) [607].

Обобщая рассмотренные работы, можно отметить, что в большинстве исследований, где корректно и на достаточно больших выборках рассматривается ассоциация полиморфных вариантов *I/D* гена *ACE* с развитием различных заболеваний, делается вывод, что многие сосудистые патологии, в том числе и Γ , ассоциированы с аллелем *D*. Гипотетическая схема участия данного аллельного варианта гена *ACE* в развитии гестоза представлена на рисунке 6.6.23.

Необходимы дальнейшие исследования на больших по численности и клинически более однородных группах больных с разными формами гестоза для обоснованного заключения о наличии причинно-следственной связи между делеционной формой гена *ACE* и заболеванием.

6.6.3.2.6. Гены эндотелия сосудов

Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. Он представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный посредник многих метаболических процессов. В частности, он задействован в таких важных физиологических процессах, как вазодилатация, нейротрансмиссия, агрегация тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляция тонуса гладких мышц и др. [575, 618]. Оксид азота (NO) образуется в результате реакции окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты — L-цитруллина. Реакция контролируется ферментом NO-синтазой (NOS), которая представляет собой гомодимер, каждая из субъединиц которого представлена двумя частями (доменами) — редуктазным и оксигеназным. Фермент становится активным только после объединения двух этих субъединиц.

В настоящее время идентифицированы три изоформы NO-синтазы: NOS1 — нейрональная (nNOS); NOS2 — индуцибельная NO-синтаза макрофагов (iNOS); NOS3 — эндотелиальная (eNOS) [96]. Каждая из этих форм имеет свои особенности как в отношении механизма действия, его локализации, так и биологического значения.

Наибольший интерес для изучения Г представляет эндотелиальная NO-синтаза (NOS3), которая стабильно экспрессируется в клетках эндотелия сосудов, в эпителии почечных канальцев, в тромбоцитах, мезангиальных клетках и др. [310, 626]. Принципиальная схема регуляции сосудистого тонуса NO-синтазой приведена на рисунке 6.6.24. Под влиянием определенных стимулов ионы Ca^{2+} входят в клетку, где в цитозоле образуется единый комплекс с белком кальмодулином. Данный комплекс в качестве кофактора активирует экспрессию гена *NOS3*, который стимулирует образование оксида азота — NO. Последний, обладая липофильными свойствами, легко диффундирует через плазматические мембраны в межклеточное пространство и проникает в клетки-мишени. Через цепь метаболических реакций, включающих гем-растворимую гуанилциклазу, циклический гуанилмонофосфат — цГМФ-протеинкиназу и Ca^{2+} -АТФазу, NO приводит к выходу ионов Ca^{2+} из гладкомышечных клеток сосудов, следствием чего является их релаксация и вазодилатация. Сосудорасширяющий эффект NO проявляется очень быстро, уже через 5–10 секунд NO включается в адаптацию тонуса сосудистой стенки к меняющимся физиологическим условиям. Кроме того, он пре-

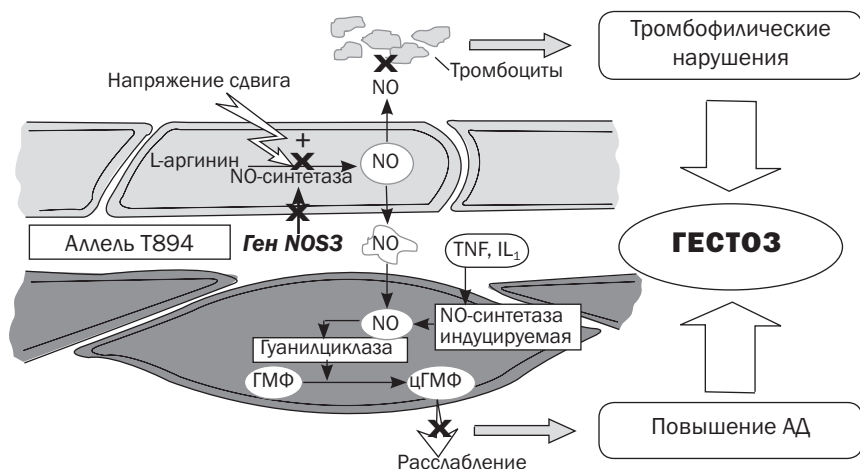


Рис. 6.6.24. Гипотетическая схема влияния аллеля T894 гена NOS на развитие гестоза

пятствует агрегации тромбоцитов, лейкоцитов и моноцитов к эндотелию, защищает сосудистую стенку при различных патологических состояниях, препятствует развитию фибринолиза и образованию тромбов [575, 602]. Биологическая активность NO стимулируется некоторыми метаболитами, включая L-аргинин, брадикинин и др.

Таким образом, оксид азота следует рассматривать как локальный тканевый гормон, регулирующий сосудистый тонус, кровоток и базальное артериальное давление.

Все эти свойства позволяют предполагать наличие ассоциации функционально значимых аллельных вариантов гена NO-синтазы 3 типа с такими заболеваниями, как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, а также различными патологиями, связанными с гипертензией при беременности. В гене NOS3 выявлено несколько полиморфных сайтов. Наиболее активно изучаются 3 из них: полиморфизм 4a/4b в 5 интроне, структурная замена 894G>T в 7 экзоне и недавно обнаруженный полиморфизм промоторной области гена NOS3 –786T>C.

Полиморфизм по интрону 5 представлен 2 аллелями: 4b, в котором имеются 5 повторяющихся фрагментов длиной 27 п. н., и 4a, в котором присутствуют 4 таких повтора. Установлено, что генотипу 4a/4a соответствует максимальный уровень базального NO. У лиц с 4b/4b-генотипом уровень NO приблизительно в 2 раза ниже, чем у 4a/4a. Гетерозиготы занимают промежуточное положение [444]. В работе австралийских авторов выявлена ассоциация данного полиморфизма с привычным не-

вынашиванием беременности. Частота аллеля *4a* оказалась достоверно выше при привычном невынашивании (20%), чем в контроле (12%, $p < 0,05$) [258]. В мексикано-испанской популяции Техаса наличие аллеля *4a* было определено как фактор риска развития Г. Частота аллеля *4a* у больных была достоверно выше (26%), чем в контроле (5%, $p < 0,0005$) [400]. В наших исследованиях при тестировании больных с тяжелым Г из Северо-Западного региона России генотипы *4a/4a* и *4a/4b* вообще не были выявлены, а частота генотипа *4b/4b* составила 100% и была достоверно выше, чем в контроле (63,8%, $p = 0,02$), несмотря на малый объем выборки пациентов ($n = 11$) [607].

Другой достаточно часто изучаемый полиморфизм *NOS3*, представляет собой замену гуанина на тимин в 894 позиции в 7 экзоне гена *NOS3*, которая приводит к замене глутамина на аспарагин в 298 позиции фермента. Повышенная частота аллеля *T894* зарегистрирована у пациентов с инфарктом миокарда и гипертонией. При анализе ассоциации данного полиморфизма с гестозом японскими авторами было выявлено достоверное повышение частоты гомозигот по *T894* ($p < 0,01$) у больных с Г (29%) по сравнению с легким Г (11%), развившимся на фоне гипертонической болезни (8%) и частотой аллеля в контрольной группе (14%) [303]. В другой японской работе также показано, что частота аллеля *T894* у больных с тяжелой формой чистого Г (23%) достоверно выше ($p < 0,007$) в сравнении с контролем (12%) [610]. Гипотетическая схема, иллюстрирующая влияние аллеля *T894* гена *NOS3* на развитие Г, представлена на рисунке 6.6.24.

Одно из самых больших по объему выборки исследований, в котором были генетически протестированы 322 пациентки с гестозом и 522 здоровые беременные женщины, показало, что генотип *T894/T894* увеличивает риск гестоза в 4,6 раза ($OR = 4,6$; $CI: 1,73-12,22$; $p = 0,002$) [401]. В этой же работе был выявлен гаплотип аллельного полиморфизма гена *NOS3*, достоверно ассоциированный с гестозом, «*T894-786C-4b*» ($OR = 2,07$; $CI: 1,33-3,23$; $p = 0,001$).

Таким образом, проведенный анализ с большой вероятностью указывает на наличие ассоциации функционально значимых аллелей гена *NOS3* с Г. Учитывая большое значение оксида азота в регуляции сосудистого тонуса, достаточно четко установленную связь аллельных вариантов этого гена с сердечно-сосудистыми заболеваниями, прежде всего с гипертонией, ишемией и инфарктом миокарда, а также с тромбофилией, его ассоциация с Г представляется вполне закономерной.

Вместе с тем прямые исследования такой ассоциации пока изучены только на нескольких популяциях и требуют дальнейшего уточнения.

Заключение

Обзор исследований, посвященных выявлению генетической составляющей Г, позволяет отметить ряд важных аспектов современного состояния этой проблемы. Г относится к мультифакториальным болезням. Поэтому *a priori* можно ожидать, что в его патогенезе принимают участие гены разных метаболических путей. Локальные генные сети Г включают в себя гены метаболизма, гены эндотелиальной дисфункции, гены сосудистой системы, ростовые факторы и цитокины, гены эндокринной системы, гены главного комплекса гистосовместимости и др. Практически в каждой генной сети уже идентифицирован один или несколько генов, аллельные варианты которых обнаруживают неслучайную ассоциацию с Г. К таковым относятся гены метаболизма (эпоксидгидролаза (*EPHX1*), плацентарная глутатион-S-трансфераза (*GSTP1*), гены антигенов гистосовместимости 1-го и 2-го типов (*HLA-DR4*, *HLA-G*, *DRB1*), гены тромбофилии (Лейденовская мутация — *F5*, ингибитор активатора плазминогена (*PAI1*), ген ключевого фермента обмена фолиевой кислоты — метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), гены сосудистой системы (ангиотензин-превращающий фермент (*ACE*)), гены эндотелия сосудов (*NOS3*). В мае 2008 г. появилось сенсационное сообщение об успешной идентификации в экспериментах на мышах главного гена-кандидата преэклампсии (гестоза) — гена *COMT*, кодирующего фермент катехол-О-метилтрансферазу, регулирующего процесс новообразования сосудов плаценты [531]. Роль мутаций этого гена в патогенезе гестоза у беременных женщин проверяется.

Несмотря на противоречивость уже имеющихся данных, обусловленную, прежде всего, существенными популяционными различиями аллельных частот исследованных генов, размером выборки и клиническими особенностями гестоза у обследованных больных, складывается впечатление, что для ряда европейских популяций аллельные варианты вышерассмотренных генов вносят значимый вклад в развитие тяжелых форм Г.

Полиморфизм некоторых генов-кандидатов изучен и в отечественной популяции, преимущественно Северо-Западного региона страны. Положительная ассоциация с Г установлена для аллелей генов *PAI1*, *TNFA*, *NOS3*, *ACE* и *GSTP1*. На их основе разработан принципиальный



Рис. 6.6.25. Алгоритм профилактики гестоза [221]

алгоритм профилактики этого тяжелого заболевания (рис. 6.6.25). Согласно предлагаемому алгоритму, профилактика этого грозного акушерского осложнения должна проводиться начиная со II триместра беременности у всех женщин групп высокого риска, одной из которых являются беременные с неблагоприятным сочетанием аллелей генов предрасположенности к Г.

Подробно схема проведения прогностического и предиктивного тестирования наследственной предрасположенности к Г, а также обсчета результатов тестирования приведены в Приложении № 1 к данной главе.

Вместе с тем анализ приведенных данных свидетельствует, что исследования по генетике Г все еще находятся на самом начальном этапе развития. В них никак не учитывается тот факт, что при мультифакториальных заболеваниях эффект любого аллеля зависит от функционального состояния других генов-кандидатов, не рассматривается очевидное влияние средовых факторов, весьма сложно поддающееся контролю. Решающее значение имеют межэтнические различия популяционных частот изучаемых полиморфных маркеров, а также патогенетические особенности самого заболевания. Возможно, что в разных популяциях развитие гестоза определяется различными генетическими маркерами.

Так, в научной литературе постоянно появляются новые работы об ассоциации Г с другими генными маркерами, например с геном адипонектина в финской популяции [245]. В свете очень интересной гипотезы о генах фактора роста плаценты, ангиогенеза трофобласта и их рецепторах (VEGFR, VEGF и PlGF) как первичном звене в патогенезе гестоза (см. Введение) заслуживает пристального внимания изучение аллельных вариантов этих генов, а также их экспрессии на разных стадиях эмбриогенеза в норме и патологии.

Комплексное изучение генетических маркеров системы фибринолиза, ренин-ангиотензиновой системы, цитокинов, NO-синтаз, эндотелиальных факторов, генов главного комплекса гистосовместимости и некоторых других, так или иначе связанных с развитием эндотелиальной дисфункции, в перспективе позволит проводить досимптоматическую диагностику предрасположенности к гестозу, что будет способствовать расширению спектра профилактических, терапевтических и диагностических мер по лечению и предупреждению данной патологии беременности.

Появление национальных проектов по гестозу [391, 401], в которых предполагается объединение результатов биохимических, клинических и молекулярно-генетических исследований в единую программу поиска, вселяет определенный оптимизм в отношении быстрого прогресса нашего понимания патогенетических механизмов этого заболевания.

Большой практический интерес представляют сравнительно новые данные о том, что существенная роль в патогенезе Г может принадлежать нарушениям процессов импринтинга целых хромосом (однородительская дисомия), их сегментов или отдельных генов (однородительской экспрессии). В настоящее время в плаценте известны около 15 импринтированных генов (7 — экспрессия только с отцовской хромосомы, 8 — с материнской) [43]. Большинство таких генов относится к транскрипционным факторам и к факторам роста плаценты [798]. Особый интерес вызывают гены фактора транскрипции STOX-1, ответственного за инвазивные свойства синцитиотрофобласта и ген *CTNNA3* (10q22), мутации в котором зарегистрированы при семейных случаях Г [782]. Исследование геномного импринтинга и хромосомных нарушений в плаценте (плацентарный мозаицизм) при гестозе — новое перспективное направление в изучении этиопатогенеза этого частого осложнения беременности.

Приложение № 1

**ПРЕДИКТИВНОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ГЕСТОЗУ**

Генные сети и гены**1. Гены, продукты которых влияют на уровень АД:**

- 1.1. *ACE* (ангиотензинпревращающий фермент) — полиморфизм **I/D**;
- 1.2. *AGT* (ангиотензиноген) — полиморфизм **M235T**;
- 1.3. *AGTR1* (рецептор I типа к ангиотензину II) — полиморфизм **A1166C**;
- 1.4. *AGTR2* (рецептор II типа к ангиотензину II) — полиморфизм **C3123A**;
- 1.5. *ADRB2* (адренорецептор B2) — полиморфизм **A48G** и **C81G**.

Тестирование полиморфизма особенно актуально при наличии хронических сосудистых патологий в анамнезе и формировании группы риска тяжелого гестоза (АГ, ИБС и др.).

2. Гены тромбофилии:

- 2.1. *F5* (фактор V свертывания крови) — полиморфизм **R506Q** (Leiden);
- 2.2. *F2* (протромбин, фактор II свертывания крови) — полиморфизм **G20210A**;
- 2.3. *FRB* (фибриноген, фактор I свертывания крови) — полиморфизм **G-455A**;
- 2.4. *PAII* (ингибитор активатора тканевого плазминогена I типа) — полиморфизм **4G/5G**;
- 2.5. *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктаза) — полиморфизм **C677T**;
- 2.6. *ITGB3* (рецептор тромбоцитарного гликопротеина IIIa) — полиморфизм **A1/A2**.

Тестирование рекомендовано для выявления группы риска тяжелого гестоза (за исключением генов *PAII* и *MTHFR* — ассоциированы со всеми формами гестоза).

3. Гены эндотелиальной дисфункции:

- 3.1. *NOS3* (эндотелиальная NO-синтаза) — полиморфизм **G894T, 4a/4b**;
- 3.2. *TNFA* (фактора некроза опухоли альфа) — полиморфизм **G-308A**;
- 3.3. *GSTP1* (глутатион-S-трансфераза I типа, плацентарная) — полиморфизм **A/B/C/D/**

Тестирование рекомендовано для формирования группы риска всех форм гестоза.

Примечание: **жирным** выделены аллельные варианты, являющиеся факторами риска заболевания.

Методы

1. Полимеразная цепная реакция, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ-анализ).
Гены *ACE*, *NOS3*, *TNFA*, *GSTP1*.
2. Метод биочипов.
Гены *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *ADRB2*, *MTHFR* («кардио-чип»);
Гены *F5*, *F2*, *FRB*, *PAII*, *MTHFR*, *ITGB3* («фибр-чип»).

Область применения

1. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития артериальной гипертензии при беременности.
2. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития гестоза.
3. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития тромбофилических осложнений при беременности.
4. Проведение своевременных профилактических и лечебных мероприятий с учетом индивидуальных генетических особенностей пациенток при указанных патологиях беременности.

Оценка результатов генетического тестирования

Для выявления женщин групп высокого риска по развитию гестоза (Г) принципиально важно определить аллельные варианты генов, относящихся к трем локальным генным сетям: генов, регулирующих кровяное давление (I), генов, контролирующих процессы свертывания крови (II) и генов, регулирующих многообразные функции эндотелия сосудов (III).

Наиболее простым и доступным методом для оценки полученных результатов является метод подсчета баллов, ранее использованный нами для оценки результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности к артериальной гипертензии (см. раздел 6.5.9). С этой целью гомозиготам по частому аллелю (аллель «дикого типа»), связанному с нормальной реакцией, то есть наиболее широко представленному в здоровой популяции, присваивается 0 баллов, гетерозиготам по двум разным аллелям — 1 балл, гомозиготам по редким аллелям, т. е. аллелям, ассоциированным с заболеванием, присваивается 2 балла. Затем для каждого пациента суммируются баллы всех исследованных генотипов, и полученная сумма делится на число изученных генов. В случае гестоза подсчет баллов проводится для каждой из 3 систем отдельно.

Для генов-регуляторов АД варьирование общей суммы баллов возможно от 0 до 10, при этом чем выше результирующий балл, тем риск гипертонии выше и тем, естественно, больше предрасположенность к развитию гестоза.

Соответственно, максимально возможная сумма баллов при гомозиготности по всем функционально неполноценным аллелям будет равна $10 : 5 = 2$, а минимальная равна 0, в случае гетерозиготности по всем 5 генам сумма баллов будет равна 5.

В плане прогноза Г достаточно условно число баллов, равное или ниже 5, можно оценивать как удовлетворительное, менее 5 — как хорошее, а более 5 — как неблагоприятное.

Вместе с тем гомозиготность даже по одному функционально неполноценному аллелю (число баллов 2) следует трактовать как показатель повышенного риска данной патологии, в отличие, скажем, от присутствия двух и даже более неблагоприятных аллелей в гетерозиготном состоянии.

Признавая определенную искусственность такой интерпретации, следует признать, что ее универсальность и простота в исполнении существенно облегчает оценку результатов генетического тестирования.

Аналогичным образом проводится оценка риска в отношении генов, контролирующих белки системы свертывания крови. Следует, однако, учитывать, что мутация FVL (Лейденовская мутация) относится к доминантным, то есть ее неблагоприятный эффект перекрывает все другие позитивные показатели системы свертывания крови (см. раздел. 6.6).

Более подробно методы оценки результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности к гестозу и другим со-

четанным (мультифакторным) заболеваниями, рассмотренным в данной монографии, приведены в наших методических рекомендациях («Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. Генетическая карта репродуктивного здоровья: методические рекомендации». Под редакцией В. С. Баранова и Э. К. Айламазяна, 2009, 68 с.).

6.6.4. Наследственная тромбофилия

Введение

Несмотря на значительные успехи современной медицины в изучении процессов гемостаза, тромбофилия, то есть склонность к повышенной коагуляции и формированию тромбов, по-прежнему представляет собой глобальную медико-социальную проблему, являясь основной причиной смертности и инвалидизации во многих развитых странах мира. Так, частота венозных тромбозов в общей популяции, согласно мировым данным, составляет 1–2 случая на 1 000 населения ежегодно [155].

В настоящее время хорошо известны различные формы тромбофилии, выявлена наследственная составляющая заболевания, установлены причины заболевания на молекулярном уровне, найдены гены, изменения в которых приводят к наследственным формам патологии, разработаны различные методы диагностики тромбофилии (иммуноферментные, ДНК-диагностика), накапливается все больше данных о важной роли тромбофилии в патогенезе многих заболеваний. Вместе с тем до сих пор не выяснена роль определенных форм тромбофилий в возникновении тромбоэмболических заболеваний, неясно значение генетических дефектов системы гемостаза в формировании тех или иных осложнений. Остаются актуальными вопросы терапии и профилактики данной патологии, поскольку, несмотря на сходные клинические проявления, разные виды тромбофилии требуют применения совершенно разных методов профилактики и лечения.

В данной главе рассмотрены наследственные формы тромбофилии, обобщены данные о генетических факторах, контролирующих систему гемостаза.

6.6.4.1. Тромбофилия

Тромбофилия (thrombophilia, от греч.: thrombos — пробка, закупорка, тромб и philia — любовь, склонность) — повышенная склонность к тромбо-

образованию вследствие генетических или приобретенных дефектов системы гемостаза — играет важную роль в патогенезе многих сердечно-сосудистых заболеваний. Артериальные и венозные тромбозы могут быть причиной инфаркта миокарда (ИМ), эмболии сосудов легких, тромбозов глубоких вен (ТГВ), тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА), ишемической болезни сердца (ИБС), инсультов и др. [7, 99]. Исследования последних лет показали, что наряду с повышенным риском тромбозов и тромбоэмболий наличие тромбофилии может быть сопряжено с повышенным риском развития акушерских и гинекологических осложнений, таких как привычное невынашивание, гестозы, антенатальная гибель плода, синдром задержки внутриутробного развития, преждевременная отслойка плаценты, повторные неудачи экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и др. [26, 135, 178, 206]. Вовлеченность тромбофилии в патогенез столь разнообразных заболеваний является основанием для ее исследования и поисков причин повышенного тромбообразования.

Условно тромбофилии подразделяют на наследственные (генетически обусловленные) и приобретенные, то есть возникающие как осложнения основного заболевания (антифосфолипидный синдром, злокачественные новообразования). Они отличаются друг от друга по этиологии, характеру патофизиологических нарушений гемостаза, осложнениям и прогнозу. Так, риск тромбозов значительно увеличивается при наличии дополнительных провоцирующих факторов, таких как хирургические операции, использование гормональных контрацептивов, различные заболевания (ожирение, сахарный диабет, онкологические заболевания), а также беременность и роды [7, 99, 206].

6.6.4.2. Формирование представлений о тромбофилии

Достижения в области медицины, биохимии и молекулярной генетики за последние 30–40 лет способствовали значительному прогрессу в решении проблемы тромбофилии. К известным со времен Р. Вирхова факторам тромбоза (замедление тока крови, нарушение целостности сосудистой стенки и усиление процессов свертывания крови) была добавлена наследственная причина этого тяжелого осложнения. В 1965 году норвежский исследователь О. Эгерберг описал семью, у членов которой была склонность к возникновению венозных тромбозов в молодом возрасте. Эта тенденция передавалась по наследству и была связана со сниженным уровнем антитромбина III. В 1968–1970 годах венгерский исследователь Г. Шаш установил, что развитие тромбофилии

возможно не только вследствие изменения уровня антитромбина III, но и в результате изменения структуры молекулы антитромбина. Дальнейшие исследования показали, что более 250 различных мутаций в гене антитромбина ассоциированы с риском развития тромбофилии [54, 193].

Вторая возможная причина тромбофилии была установлена только в 1981 году американским ученым Дж. Гриффином, который описал дефицит протеина С. Чуть позже в 1983 году голландцем А. Брокманом было показано, что дефицит протеина С наследуется по аутосомно-доминантному типу. Выявление новой формы наследственной тромбофилии свидетельствовало о полигенном характере заболевания, что было подтверждено последующими исследованиями. Так, Ч. Эсмон и П. Комп в 1984 году описали наследственную предрасположенность к тромбозам вследствие дефекта протеина С [538].

Настоящим прорывом в понимании молекулярных механизмов тромбофилии было открытие устойчивости к активированному протеину С. В 1993 году шведский ученый Б. Дальбек описал семейную тромбофилию, причиной которой была неспособность крови реагировать на активированный протеин С. Затем Р. М. Бертина в университете г. Лейдена выявил молекулярную основу этого феномена — Лейденскую мутацию G1691A в гене фактора 5. Тромбофилия, обусловленная данным генетическим дефектом, получила название «резистентность к активированному протеину С» [54].

Первые работы по изучению генетического риска тромбоза были связаны с идентификацией мутаций, приводящих к снижению концентрации или функции коагуляционных белков. Последующие исследования показали, что повышенный уровень белков в крови также может быть фактором риска образования тромбозов. В 1996 году голландские ученые сообщили об открытии мутации гена, ответственного за формирование молекулы протромбина. Наличие аденина в положении 20210 нуклеотидной последовательности, обуславливающей наличие такого мутированного протромбина, может приводить к увеличению содержания белка в крови почти на 25 % и повышать риск развития тромбофилических осложнений [538].

Впоследствии были идентифицированы генетические дефекты всех звеньев системы гемостаза [135]. Было показано, что тромбофилия может быть обусловлена мутациями в генах, кодирующих коагуляционные факторы, нарушениями в генах антикоагулянтной и фибринолитической систем, гликопротеинов тромбоцитарных рецепторов.

Несмотря на то что ключевая роль системы гемостаза в поддержании жидкого состояния крови предопределила изначально повышенный интерес к изучению факторов, участвующих в процессах коагуляции и фибринолиза, было обнаружено, что в формировании тромбофилии важную роль могут играть генетические дефекты и других метаболических систем. Так, в 1995 году С. Falcon и Р. Mannucci, М. den Heijer и Н. Blom, а затем и многие другие показали, что гипергомоцистеинемия повышает склонность к развитию тромбоза в 2,5 раза [82].

6.6.4.3. Система гемостаза

Система гемостаза представляет собой совокупность биохимических процессов, обеспечивающих сохранение жидкого состояния крови, поддержание ее нормальных реологических свойств, предупреждение и остановку кровотечений. В системе гемостаза принимают участие факторы свертывающей, естественной антикоагулянтной и фибринолитической систем крови. При повреждении сосудов активируется свертывающая система крови. В физиологических условиях прокоагуляционные и противосвертывающие процессы в системе гемостаза уравновешены, что обеспечивает жидкое состояние крови, то есть ее нормальные реологические свойства. Смещение равновесия в системе гемостаза вследствие эндогенных или экзогенных факторов может приводить или к гемофилии, или, наоборот, к повышенному тромбообразованию, то есть к тромбофилии.

6.6.4.3.1. Свертывающая система

Основной функцией свертывающей системы крови является остановка кровотечений при повреждении сосудов. По современным представлениям, в остановке кровотечения участвуют 2 механизма: **клеточный (сосудисто-тромбоцитарный)** и **плазменный (коагуляционный)**.

Сосудисто-тромбоцитарный, или первичный, гемостаз обеспечивает остановку кровотечения из сосудов диаметром менее 100 мкм (капилляры, посткапиллярные венулы и артериолы). Остановка кровотечения обеспечивается за счет сужения сосудов (спазмом) и их закупорки агрегатами тромбоцитов. При повреждении стенки сосудов обнажается субэндотелиальный слой, обладающий тромбогенными свойствами, он содержит ряд молекул (фактор Виллебранда, фибронектин, ламинин, коллаген и др.), которые способствуют адгезии и агрегации тромбоцитов. Степень адгезии и агрегации тромбоцитов зависит от присутствия на их мембранах

рецепторных гликопротеинов (GP1b, GP2b, GP1a и GP3a). Гликопротеин GP1b связывает фактор Виллебранда, GP1A вместе с GP2A формирует рецептор для коллагена, обеспечивая адгезию тромбоцитов к субэндотелию. Гликопротеин GP3A вместе с GP2B в составе рецептора обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с фибриногеном, что приводит к агрегации тромбоцитов и формированию тромба (первичная пробка). Повышение склонности тромбоцитов к агрегации вследствие тех или иных причин может приводить к увеличению риска возникновения тромбозов.

При повреждении крупных кровеносных сосудов (артерий, вен, артериол), особенно с достаточно высоким кровяным давлением, взаимодействие сосудов и тромбоцитов не в состоянии обеспечить надежный гемостаз. В подобных случаях ведущую роль в обеспечении остановки кровотечения выполняет система **гемокоагуляции (коагуляционный каскад)**, приводящая в конечном счете к образованию плотного фибринового сгустка (рис. 6.6.26). Тромбоциты являются связующим звеном этих механизмов. Они формируют первичную пробку и обеспечивают сопряжение обоих механизмов гемостаза. Фосфолипидные мембраны тромбоцитов представляют собой каталитическую поверхность для сборки ферментативных комплексов каскада коагуляции. Ферменты коагуляционного каскада принадлежат к семейству сериновых протеаз и присутствуют в плазме в виде зимогенов (неактивных предшественников). В результате ограниченного протеолиза они активируются до функционально активных форм.

При гемокоагуляции происходит ферментативное превращение растворимого белка фибриногена (F1) при участии тромбина (F2a) в нерастворимый фибриновый полимер. Тромбин расщепляет фибриноген с образованием мономеров фибрина, которые полимеризуются и связываются друг с другом, формируя стабильный сгусток (тромб). В процессе активации тромбина можно выделить две стадии. На **первой** в результате инициации внешнего и/или внутреннего путей свертывания крови происходит активация F10. На **второй** стадии с участием активированного фактора F10 (F10a) и фактора F5, выполняющего вспомогательную кофакторную функцию, формируется протромбиназный комплекс (F10a+F5a+Ca²⁺+фосфолипиды), который, в свою очередь, осуществляет эффективное превращение протромбина в тромбин. Условием образования высокоактивного протромбиназного комплекса является ограниченный протеолиз фактора 5 с превращением его в фактор F5a под действием фактора F10a, а далее и тромбина. По механизму обратной связи тромбин активирует кофакторы F8 и F5, чем значительно усиливает механизм

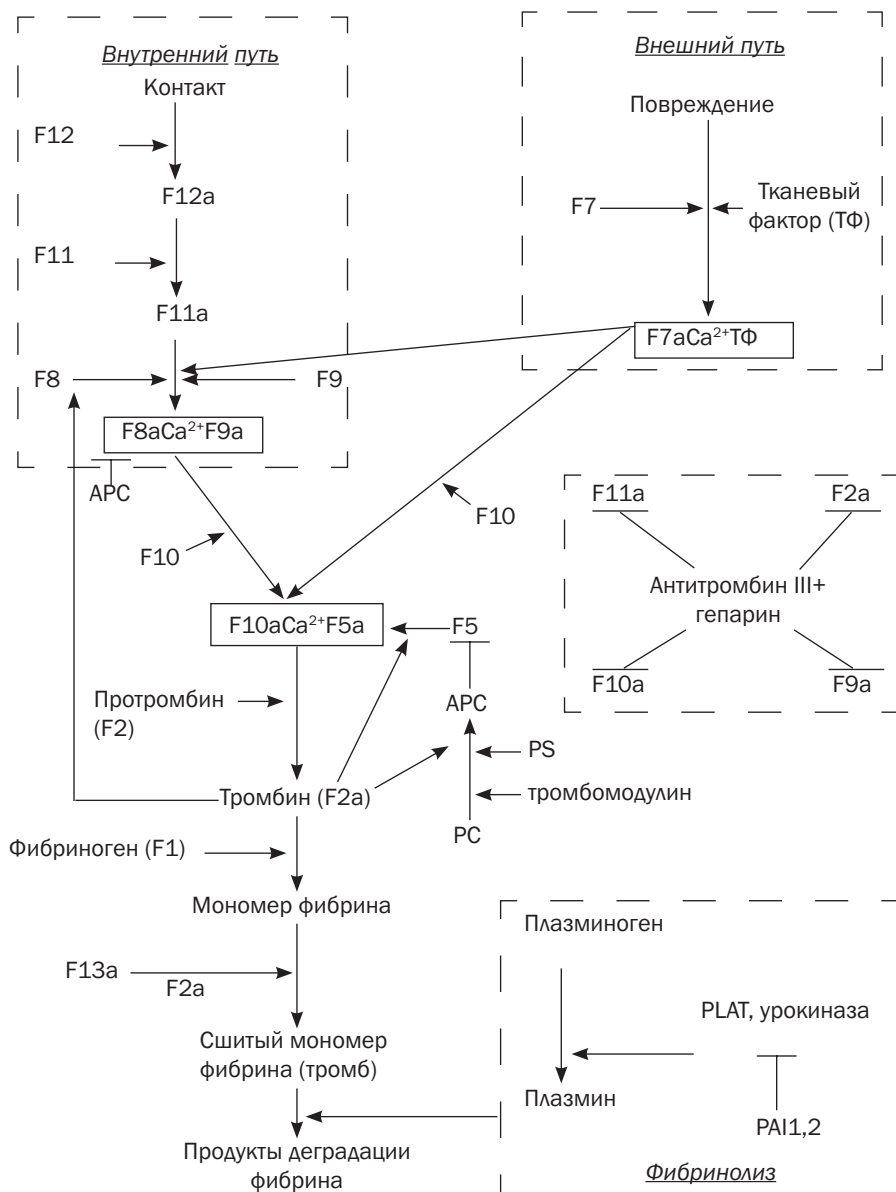


Рис. 6.6.26. Схема свертывания крови. Выделены комплексы, формирующиеся на фосфолипидных мембранах (пояснения в тексте)

свертывания. Увеличение содержания коагуляционных факторов в крови под воздействием внешней среды или вследствие генетических поломок может приводить к усилению каскада коагуляции, сдвигу равновесия в системе гемостаза в сторону тромбообразования.

6.6.4.3.2. Естественная антикоагулянтная система

Реакции коагуляционного каскада уравниваются естественной антикоагулянтной системой, играющей ключевую роль в ограничении процесса свертывания местом повреждения, в сохранении крови в жидком состоянии и предупреждении внутрисосудистого свертывания крови. Функционирование системы определяется наличием в плазме противосвертывающих веществ, или естественных антикоагулянтов (антитромбин III, гепарин, протеины С и S, ингибитор тканевого пути свертывания — TFPI, тромбомодулин и др). Антитромбин III — плазменный протеин, ингибирующий активность сериновых протеаз внутреннего и внешнего путей свертывания. Его действие усиливается в присутствии эндогенного сульфатированного глюкозамингликана — гепарина. Антитромбин III принимает участие в инактивации тромбина, факторов F9a, F10a и F11a. Тромбомодулин, расположенный на внутренней стенке кровеносных сосудов, инактивирует тромбин. Плазменные кофакторы свертывания — F8a и F5a факторы — инактивируются в результате расщепления их естественным антикоагулянтом протеином С, активация которого тромбином в присутствии тромбомодулина, связанного с эндотелиальными клетками, значительно ускоряется протеином S, действующим как кофактор. В результате снижается стабильность протромбиназного комплекса и уменьшается скорость образования тромбина. Снижение активности физиологических антикоагулянтов, необходимых для поддержания циркулирующей крови в жидком состоянии, может быть причиной повышенного тромбообразования.

6.6.4.3.3. Фибринолиз

В ответ на образование фибриновых нитей при свертывании крови включается система фибринолиза, задачей которого является лизис образовавшегося кровяного сгустка под действием плазмина — сериновой протеиназы плазмы крови. Плазмин образуется в результате энзиматических реакций из плазминогена. Плазминоген может активироваться F11a и F12a, а также протеиназами различных тканей, например активатором плазминогена из почек (урокиназой) и тканевым активатором

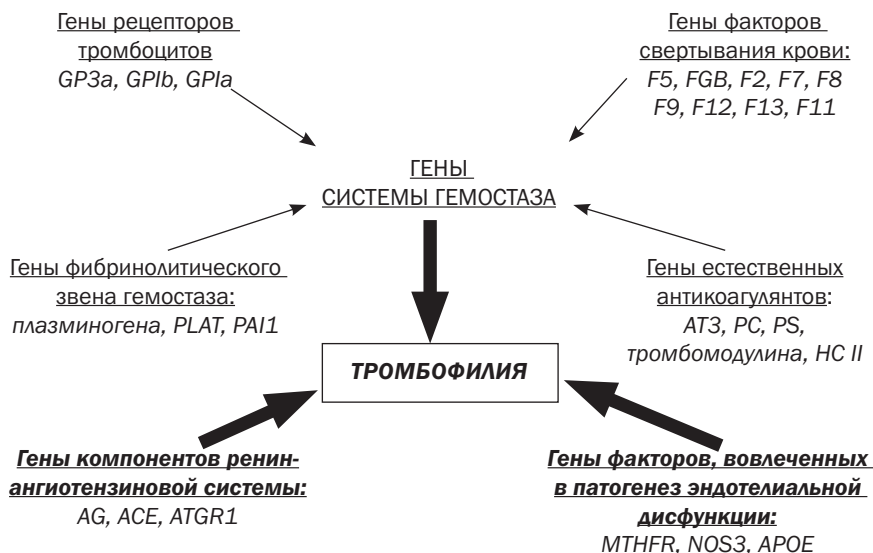


Рис. 6.6.27. Генная сеть тромбозии

плазминогена (ТАП) из эндотелия сосудов. Протеолитическая активность ТАП и урокиназы регулируется специфическими ингибиторами протеаз, а именно ингибиторами активатора плазминогена типов 1 и 2 (PAI1, 2). Фибринолитическая активность крови во многом определяется соотношением активаторов и ингибиторов фибринолиза. При ускорении свертывания крови и/или ослаблении фибринолиза создаются благоприятные условия для развития тромбозов [7, 538].

6.6.4.4. Гены наследственной тромбозии

К настоящему времени уже выявлен целый ряд генетических изменений, напрямую или опосредованно влияющих на функциональное состояние системы гемостаза и обуславливающих склонность к повышенному тромбообразованию, на основании которых можно построить генную сеть для тромбозии (рис. 6.6.27). В нее можно включить гены системы гемостаза (гены факторов свертывания крови и тромбоцитарных рецепторов, гены фибринолитического звена гемостаза и естественных антикоагулянтов) (табл. 6.6.14), гены компонентов ренин-ангиотензиновой системы (см. раздел 6.5), гены факторов, вовлеченных в патогенез эндотелиальной дисфункции (рис. 6.6.27).

Наиболее значимым и часто встречающимся наследственным дефектом, приводящим к тромбозии, является Лейденская мутация

Таблица 6.6.14

Гены наследственной тромбофилии

Ген	Белковый продукт	Мутация/ Полиморфизм	Частота встре- чаемости в популяции, %	OMIM
<i>F5</i>	Коагуляционный фактор 5	1691G>A (Arg506Gln), мутация Лейден	3–7	227400
<i>F2</i>	Коагуляционный фактор 2/ Протромбин	20210G>A в 3'-концевой некодирующей части гена	1–3	176930
<i>FGB</i>	β-фибриноген	G>A в –455 положении промоторной области гена	20–30	134830
<i>F7</i>	Коагуляционный фактор 7	10976G>A (Arg353Gln)	14–16	227500
<i>PAI1</i>	Ингибитор актива- тора плазминогена 1-го типа	5G>4G в –675 положении промоторной области гена	50–60	173360
<i>PLAT</i>	Тканевой активатор плазминогена	I/D-полиморфизм	50–60	173370
<i>ITGB3</i>	Гликопротеин 3а (GP3A)	1565T>C (Leu33Pro), PLA1/PLA2	10–15	173470
<i>ITGA2</i>	Гликопротеин 1а (GPIA)	807C>T	40	192974
<i>MTHFR</i>	Метилентетрагид- рофолатредуктаза	677C>T	20–40	607093

фактора 5 (1691G>A) [135, 561]. Следствием Лейденской мутации фактора 5 является повреждение системы протеина С. Замена гуанина на аденин в положении 1691 в гене фактора 5 приводит к замене аминокислоты аргинина на глутамин в положении 506 (Arg506Gln), соответствующем главному сайту специфического расщепления фактора 5, осуществляемого активированным протеином С (APC). В результате мутации замедляется деградация фактора 5а, стабилизируется протромбиназный комплекс, отмечается увеличение скорости образования тромбина, вследствие чего могут усиливаться прокоагуляционные свойства крови, развиться резистентность к APC. Прокоагуляционное действие фактора 5 Лейден может быть усилено за счет активации ингибитора фибринолиза (TAFI) тромбином. Кроме того, выступая в роли кофактора при расщеплении фактора 8 (F8a) в реак-

ции с APC, фактор 5 в случае Лейденской мутации может замедлять деградацию F8a [135, 206].

В развитии тромбофилии также важную роль может играть мутация в гене протромбина (20210G>A) [561]. Мутация протромбина 20210G>A локализована в 3'-концевой нетранслируемой области гена протромбина. Механизм прокоагулянтного действия данной мутации вероятно, связан с усилением синтеза протромбина у носителей аллеля 20210A вследствие увеличения стабильности мРНК фактора 2 и/или повышения эффективности ее трансляции. В результате мутации происходит смещение равновесия в системе гемостаза в сторону образования тромбина и усиления свертывания крови [112, 135].

Наследственные формы тромбофилии могут быть также ассоциированы с мутациями генов, кодирующих субъединицы фибриногена, а именно с полиморфизмом –455G>A в 5'-промоторной области гена, кодирующем β -субъединицу фибриногена [135, 538]. Предполагается, что протромботический эффект данного полиморфизма обусловлен разными уровнями синтеза фибриногена у носителей аллелей –455G и –455A. Показано, что полиморфизм –455G>A является независимым предиктором повышенного уровня фибриногена, что связано с активной экспрессией аллеля –455A. Кроме того, данный аллель в большей степени по сравнению с аллелем –455G активируется интерлейкином-6 и, возможно, другими медиаторами иммунного ответа [561].

В последние годы особое внимание уделяется еще одному коагуляционному фактору F7. В гене *F7* уже выявлен целый ряд изменений, большинство из которых носят протективный характер и ассоциированы со снижением активности F7 и его содержания в крови. Полиморфизм в гене *F7* 10976G>A (*Arg(R)353Gln(Q)*) может обуславливать замедленную активацию факторов 9 и 10, ослабление коагуляционного каскада и в конечном счете приводить к сниженному риску развития тромбозов вследствие снижения концентрации и активности F7 в крови у носителей аллеля A. Наличие аденина в гетерозиготном состоянии вызывает снижение концентрации и активности F7 в крови примерно на 25 %, а в гомозиготном — примерно на 50 % по сравнению с носителями «дикого» аллеля G [741].

Наряду с нарушениями коагуляционной системы гемостаза, к тромбофилии приводят и мутации генов факторов фибринолитической системы. Одной из причин снижения фибринолитической активности крови является 5G>4G полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена

1-го типа в -675 положении от стартовой точки промотора (-675 5G>4G) [54, 206]. Гиперкоагуляция у носителей генотипа 4G/4G, вероятно, обусловлена повышением уровня ингибитора активатора плазминогена (PAI1). В экспериментах на культуре клеток HepG2 показано, что продукт аллеля 4G может связываться только с активатором транскрипции, что приводит к увеличению синтеза PAI1, тогда как продукт аллеля 5G связывается как с активатором, так и супрессором. Следствием этого является низкий уровень транскрипции при 5G-генотипе [765]. Другое изменение работы данной системы связано с наличием инсерции (аллель I) Alu-повтора длиной 311 п. н. в 8 интроне гена *PLAT*. Инсерционно-делеционный полиморфный вариант этого гена ассоциирован с риском сосудистых осложнений у больных со стенокардией и с атеросклерозом, а также с ишемической болезнью сердца и различными тромбоэмболиями.

Еще одной причиной тромбофилии являются дефекты генов гликопротеинов тромбоцитарных рецепторов. Среди них особое внимание уделяют полиморфизму генов гликопротеинов *GP3a* 1565T>C (*PLA1/PLA2*) и *GPIA* 807C>T. Замена тимина на цитозин в экзоне 2 гена *GP3a* в положении 1565 приводит к замене лейцина на пролин в гликопротеине GP3a в позиции 33 (Leu33Pro), что сказывается на агрегационных свойствах тромбоцитов вследствие конформационного изменения N-терминальной дисульфидной петли GP3a, участвующей в связывании фибриногена [753]. Замена цитозина на тимин в положении 807 в гене, кодирующем GP1A, может приводить к увеличению плотности рецепторов GP1A/GP2A к коллагену на поверхности тромбоцитов и, таким образом, вызывать усиление адгезии тромбоцитов к эндотелию у носителей аллеля T и повышать риск тромбозов [112].

Кроме мутаций факторов свертывающей и противосвертывающей систем в качестве одной из причин развития тромбофилии также рассматривают гипергомоцистеинемию, причиной которой могут быть мутации гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*). К настоящему времени в гене *MTHFR* выявлено 9 мутаций. Наиболее изученной является мутация 677C>T, связанная с заменой аланина на валин и приводящая к образованию термолabileльной формы фермента со сниженной на 50% энзиматической активностью. Нарушение метилирования гомоцистеина при переходе его в метионин приводит к повышению его уровня в крови и развитию легкой или умеренной гипергомоцистеинемии. Протромботический эффект гипергомоцистеинемии обусловлен токсическим действием гомоцистеина на эндотелий сосудов, в результа-

те которого повышается прокоагулянтный потенциал эндотелиальных клеток. При гипергомоцистеинемии может возникать резистентность к активированному протеину С вследствие ковалентного соединения гомоцистеина с активированным фактором 5 [495, 538].

6.6.4.5. Особенности клинического проявления наследственных форм тромбофилии

Многочисленные исследования наследственной тромбофилии показали большие различия в частоте встречаемости отдельных форм тромбофилии в популяции, их разный вклад в риск развития тромбозов, в формирование осложнений. Установлена роль других экзогенных и эндогенных факторов в манифестации генетических дефектов системы гемостаза, приводящих к тромбофилии. Важным направлением в исследовании тромбофилии является изучение тромбофилических состояний у беременных женщин и влияние нарушений системы гемостаза на риск тромбозов и тромбоэмболий во время беременности, родов и послеродовом периоде, в участии тех или иных генетических форм тромбофилии в развитии акушерских и гинекологических осложнений [178, 206].

Наиболее изученной и значимой является наследственная форма тромбофилии, связанная с мутацией фактора 5, называемая Лейденской. Данную мутацию выявляют у 20–40% больных с венозными тромбозами и тромбоэмболиями. Находясь в гетерозиготном состоянии, Лейденская мутация сопряжена с 3–7-кратным увеличением риска тромбообразования, в гомозиготном состоянии этот риск повышен в 80–100 раз. Мутация отмечена у 60% женщин с тромбозами во время беременности и послеродовом периоде. Риск тромботических проявлений у носителей Лейденской мутации может возрастать при наличии ряда таких провоцирующих факторов, как хирургические вмешательства, длительная иммобилизация, травмы, у женщин — прием оральных контрацептивов или гормонзаместительная терапия. В последние годы в литературе появились сообщения об ассоциации Лейденской мутации с такими акушерскими осложнениями, как синдром потери плода, преэклампсия, HELLP-синдром (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets), преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты. Выявлены популяционные различия в частоте встречаемости мутации фактора 5. В Европе ее частота колеблется от 2 до 6%, причем мутация чаще встречается среди жителей Северной Европы,

тогда как у жителей Средиземноморья она обнаруживается реже. В популяциях коренных жителей Азии, Африки, Австралии и Америки она практически не встречается [538].

Большой практический интерес представляет мутация протромбина 20210G>A. Риск развития тромбозов у носителей данной мутации возрастает в 2–5 раз. В гетерозиготном состоянии мутация встречается у 2,3% людей в общей популяции и у 6,2% больных с венозными тромбозами. У беременных риск венозной тромбоэмболии значительно возрастает при наличии этой мутации, при этом наблюдается высокий риск тромбозов не только в периферических венах и венах головного мозга, но и в артериях, что приводит к развитию ишемических инсультов и ИБС. Аллель 20210A обнаружен у 7,8% женщин с потерей плода. Показана ассоциация данной мутации с задержкой развития плода, преждевременной отслойкой нормально расположенной плаценты. Многочисленные исследования показали, что в Европе частота мутации находится в диапазоне от 0,7 до 4%. Она наиболее распространена среди жителей Южной Европы, где встречается почти в 2 раза чаще, чем среди жителей Северной Европы. В популяциях коренных жителей Азии и Африки мутация 20210G>A, так же как и мутация фактора 5 Лейден, практически не встречается [112].

В ряде исследований показана ассоциация полиморфизма 455G>A в гене β -субъединицы фибриногена с развитием тромбофилических осложнений. Большая часть исследований данного полиморфизма посвящена изучению его роли в развитии артериального тромбоза. Аллель –455A в гомозиготном состоянии встречается у 5–10% лиц европеоидной расы. Замена –455G>A является фактором риска периферического и коронарного атеротромбоза, а также ассоциирована со степенью атеросклеротического поражения сосудов. При дисфибриногенемии возрастает риск тромбозов, невынашивания беременности, тромбоэмболических осложнений в родах и послеродовом периоде (см. раздел 6.6.2) [52].

В последние годы особое внимание уделяется изучению полиморфизма гена *F7 10976G>A (Arg(R)353Gln(Q))*. Наличие «дикого» аллеля G в гомозиготном состоянии является дополнительным фактором риска развития тромботических осложнений и акушерских патологий (остановка развития беременности на малых сроках, задержка внутриутробного развития плода, гипотрофия плода, фетоплацентарная недостаточность, аномалии внутриутробного развития плода, неудачные попытки ЭКО). Наличие аллеля A значительно снижает риск возникновения ИМ, гипертонической болезни, атеросклероза и неблагоприятного исхода беременности.

Исследования полиморфизма $-675\ 5G>4G\ PAII$ показали, что аллель $-6754G$ ассоциируется с высокой частотой венозных и артериальных тромбозов, с повышенным риском возникновения ИМ [756]. Наличие аллеля $-6754G$ отмечено при многих осложнениях беременности — бесплодие, ранние преембриональные и эмбриональные потери, гестозы и неудачи ЭКО [135, 206, 561].

Интенсивно исследуется полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов $GP3a\ 1565T>C\ (PLA1/PLA2)$ и $GPIA\ 807C>T$ и связь этих изменений с повышенным риском развития тромбозов и их осложнений. Установлено, что «дефектный» аллель $PLA2$ может быть причиной генетической предрасположенности к целому ряду сердечно-сосудистых заболеваний, в числе которых ИМ, ИБС, коронарный атеросклероз, венозные и артериальные тромбозы, наследственная тромбоцитопения Гланцманна, а также к таким акушерским осложнениям, как поздний гестоз и задержка развития плода [8, 565, 659]. Наличие аллеля $807T$ ассоциировано с повышенным риском развития ранних артериальных тромбозов, ИМ, ишемического инсульта, среди акушерских осложнений возможна фетоплацентарная недостаточность. Популяционная частота аллеля $PLA1$ гена $GP3a$ для населения Европы составляет, по разным данным, 85–90%, а аллель $PLA2$ встречается с частотой 10–15%. У африканского населения частота аллеля $PLA2$ снижается до 5–8%. Он практически не встречается в азиатских популяциях. Частота аллеля $807T$ гена $GPIA$ в европейской популяции, по разным оценкам, составляет примерно 40% [112].

Риск развития венозных и артериальных тромбозов значительно увеличивается при гипергомоцистеинемии, наличие которой чаще всего обусловлено дефицитом фермента 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы, что и определяет повышенный интерес к мутации $677C>T$ в гене $MTHFR$. Среди населения Европы частота генотипа $677TT$ составляет 5–15%. У больных с венозными и артериальными тромбозами его встречаемость, по одним данным, достигает 20% и более. Согласно другим авторам, не отмечается существенной разницы частот генотипа $677TT$ у здоровых индивидов и у больных с тромбофилией [112, 538]. Установлено, что гомозиготная форма мутации $677C>T\ MTHFR$ может способствовать развитию многих осложнений беременности, таких как гестоз, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, внутриутробная задержка развития плода, синдром потери плода, увеличение риска развития гипертензии при беременности и рождения ребенка с дефектом нервной трубки [135, 178, 206].

Одним из важных направлений в изучении наследственной тромбофилии является исследование ее комбинированных форм. В общей популяции они встречаются у 5 % населения. Их наличие на 70–80 % повышает риск развития тромбозов и осложнений беременности. Присутствие сразу двух мутаций (фактор 5 Лейден и протромбин 20210G>A) увеличивает риск тромбоза в несколько раз по сравнению с носителями изолированных мутаций. Сочетание гипергомоцистемии и других форм тромбофилии также значительно повышает риск развития тромбозов. При наличии мутации фактора 5 Лейден и гипергомоцистемии риск тромбоза увеличивается в 10–20 раз. Отмечено, что комбинированные формы тромбофилии увеличивают риск потери плода, задержку развития плода, вероятность преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, развития гестоза, бесплодия. В частности, комбинированные формы тромбофилии были выявлены у 15 % беременных с тяжелым гестозом [178, 206].

Заключение

Патогенез наследственных форм тромбофилии обусловлен генетическими дефектами всех звеньев системы гемостаза. Повышенная склонность к тромбообразованию может быть вызвана мутациями в генах, контролирующих синтез коагуляционных факторов, генов антикоагулянтной и фибринолитической систем, а также генов гликопротеинов тромбоцитарных рецепторов и ферментов, участвующих в обмене гомоцистеина. Наличие таких нарушений при беременности может быть причиной тромбоэмболических и акушерских осложнений, которых можно избежать в случае своевременной диагностики наследственной тромбофилии и уточнения ее формы. Точная диагностика и ранняя профилактика наследственных тромбофилий являются важным условием безопасного материнства. По нашему опыту, генетическое тестирование системы фибринолиза желательно для всех беременных женщин. Оно особенно показано в случае тромбозов при предыдущих беременностях, при невынашивании беременности, наличии ревматизма, заболеваний почек, артериальной гипертензии, ожирения и пр. Также тестирование совершенно необходимо для выделения женщин групп высокого риска тромбозов, обусловленных наследственными факторами. Для оценки риска данного заболевания с успехом может быть применен метод подсчета баллов (см. 6.1; 6.5). Алгоритм генетического тестирования наследственной предрасположенности к тромбофилии приведен в Приложении № 2 к данной главе.

Приложение № 2

ТРОМБОФИЛИЯ И ТРОМБОЗЫ**ПРЕДИКТИВНОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ****Гены****1. Гены, продукты которых влияют на уровень АД:**

ACE (ангиотензинпревращающий фермент) — полиморфизм I/D;
AGT (ангиотензиноген) — полиморфизм M235T;
AGTR1 (рецептор I типа к ангиотензину II) — полиморфизм 1166A>C;
AGTR2 (рецептор II типа к ангиотензину II) — полиморфизм 3123C>A;
ADRB2 (β-адренорецептор 2) — полиморфизм 48A>G и 81C>G;
BKR (рецептор 2 к брадикинину) — полиморфизм –58T>C;
REN (ренин) — полиморфизм I9–83G>A.

Особенно актуально тестирование на полиморфизм данной группы генов при наличии хронических сосудистых патологий в анамнезе и формировании группы риска тромбофилии при тяжелом гестозе.

2. Гены факторов свертывания крови:

F5 (фактор V свертывания крови) — полиморфизм **1691G>A**
(**R506Q** — Leiden);
F2 (протромбин, фактор II свертывания крови) — полиморфизм
20210G>A;
FGB (фибриноген, фактор I свертывания крови) — полиморфизм
–455G>A;
F7 (фактор VII свертывания крови) — полиморфизм **10976G>A**.

Данная группа генов рекомендована для выявления группы риска любых заболеваний, в анамнезе которых есть нарушение свертывания крови.

3. Гены системы фибринолиза:

PAI1 (ингибитор активатора тканевого плазминогена I типа) — полиморфизм 5G/4G;
PLAT (тканевый активатор плазминогена) — полиморфизм I/D.

Данная группа генов рекомендована для выявления группы риска заболеваний, в анамнезе которых есть нарушение свертывания крови, изменения тонуса сосудов.

4. Гены гликопротеинов тромбоцитарных рецепторов:

ITGB3 (GP3A) (рецептор тромбоцитарного гликопротеина IIIa) — полиморфизм A1/A2 (1565T>C);

ITGA2 (GPIA) (рецептор тромбоцитарного гликопротеина Ia) — полиморфизм 807C>T.

Данная группа генов рекомендована для выявления группы риска любых заболеваний, в анамнезе которых есть нарушение свертывания крови.

5. Гены-регуляторы обмена гомоцистеина:

MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза) — полиморфизм 677C>T.

Данный ген рекомендован для выявления группы риска гипергомоцистеинемии.

Примечание: **жирным** выделены аллельные варианты, являющиеся факторами риска заболевания.

Рекомендуемые методы

1. Полимеразная цепная реакция, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ-анализ).
2. Метод биочипов.

Область применения

1. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития артериальной гипертензии при беременности.
2. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития гестоза.
3. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития тромбофилических осложнений при беременности.
4. Досимптоматическое выявление групп высокого риска развития тромбозов различной этиологии.
5. Проведение своевременных профилактических и лечебных мероприятий с учетом индивидуальных генетических особенностей пациентов при указанных патологиях.

Пример оценки риска наследственной тромбофилии методом подсчета баллов

Приведем пример «стандартного» варианта ответа по результатам генетического тестирования на наличие риска тромбофилии у пациента К. и краткое заключение к нему.

Таблица 6.6.15

Результат мультигенного тестирования образца ДНК пациентки К.

Ген	Полиморфизм	Риск (наличие/отсутствие)
<i>ACE</i>	I/D	+
<i>AGT</i>	M/M	—
<i>AGTR1</i>	A/A	—
<i>AGTR2</i>	C/C	—
<i>ADRB2</i>	A/A C/C	—
<i>BKR</i>	T/C	+
<i>REN</i>	G/A	+
<i>F5</i>	G/A	+
<i>F2</i>	G/G	—
<i>FGF</i>	A/A	+
<i>F7</i>	G/G	—
<i>PAI1</i>	4G/4G	+
<i>PLAT</i>	D/I	+
<i>ITGB3 (GP3A)</i>	T/C	+
<i>ITGA2 (GPIA)</i>	C/C	—
<i>MTHFR</i>	C/T	+

Результаты исследования показывают, что пациентка К. является обладательницей следующего генотипа и имеет следующие риски (табл. 6.6.15).

На основании результатов данного тестирования врач может сделать вывод о том, что пациентка имеет во всех проанализированных генетических сетях маркеры риска тромбоза.

Однако если делать более тонкий статистический анализ, в частности с использованием метода подсчета баллов, можно заметить, что вклад проанализированных генетических маркеров исследуемых систем в риск развития тромбоза будет разный, а для некоторых систем и вообще будет отсутствовать.

Воспользуемся предложенным подходом на основе баллов (см. главу 5) и проанализируем, как будут выглядеть результаты тестирования по генным системам с учетом баллов (условно предполагая, что вклад каждого гена в систему в риск равный, за исключением мутации в факторе 5 — при наличии данного аллеля значение балла будет равно 2). В таблице 6.6.16 приведены расчеты суммы баллов генотипов в проанализированных системах генов, продукты которых связаны в единую биохимическую цепь.

На основании метода подсчета баллов генотипов проанализированных генов можно утверждать, что у пациентки К. риск тромбоза,

Таблица 6.6.16

**Результат мультигенного тестирования образца ДНК пациентки К.
с учетом балльного метода**

Ген	Полиморфизм	Оценка (в баллах)	Сумма баллов	Наличие/отсутствие риска (при превышении пороговой суммы баллов генотипов)
Гены, продукты которых влияют на уровень АД (пороговая сумма баллов — 8)				
<i>ACE</i>	<i>I/D</i>	1	3	—
<i>AGT</i>	<i>M/M</i>	0		
<i>AGTR1</i>	<i>A/A</i>	0		
<i>AGTR2</i>	<i>C/C</i>	0		
<i>ADRB2</i>	<i>A/A C/C</i>	0		
<i>BKR</i>	<i>T/C</i>	1		
<i>REN</i>	<i>G/A</i>	1		
Гены факторов свертывания крови (пороговая сумма баллов — 4)				
<i>F5</i>	<i>G/A</i>	2	4	+
<i>F2</i>	<i>G/G</i>	0		
<i>FGB</i>	<i>A/A</i>	2		
<i>F7</i>	<i>G/G</i>	0		
Гены системы фибринолиза (пороговая сумма баллов — 2)				
<i>PAI1</i>	<i>4G/4G</i>		3	+
<i>PLAT</i>	<i>D/I</i>			
Гены гликопротеинов тромбоцитарных рецепторов (пороговая сумма баллов — 2)				
<i>ITGB3</i> (<i>GP3A</i>)	<i>T/C</i> <i>C/C</i>		1	—
<i>ITGA2</i> (<i>GPIA</i>)				
Гены-регуляторы накопления гомоцистеина				
<i>MTHFR</i>	<i>C/T</i>		1	+

который может быть следствием изменения генов, продукты которых участвуют в регуляции АД и адгезии тромбоцитов, не высок, тогда как наибольшее значение данной пациентке и врачу, наблюдающему ее, нужно придавать результатам тестирования генов факторов свертывания крови и системы фибринолиза. И именно на основе последнего врачу-генетику необходимо выстраивать профилактические и лечебные мероприятия. Подробнее — «Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. Генетическая карта репродуктивного здоровья: методические рекомендации». Под редакцией В. С. Баранова и Э. К. Айламазяна, 2009, 68 с.).

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Жизнь человека, как и любого живого организма, является, в конечном счете, результатом непрерывного взаимодействия его генома и окружающей среды. Вся программа индивидуального развития, записанная в генах, и ее аранжировка, закодированная в повторяющихся последовательностях ДНК, успешно реализуются только благодаря удивительной гармонии между геномом и окружающей средой, закрепленной и направляемой естественным отбором.

Геномика — наука, изучающая гены и их продукты как динамически развивающуюся систему, их взаимодействие и влияние на метаболические пути и физиологические реакции всего организма. Решительно вторгаясь во все сферы медицины и фундаментальные проблемы науки о человеке, геномика привела к возникновению новых направлений в медицине — **нутригеномика, фармакогеномика, токсикогеномика, дерматогеномика, медицина антистарения, спортивная генетика и др.** (см. главу 1). Основу этих направлений составляет генетическое разнообразие, создаваемое генетическим полиморфизмом, являющимся определенным буфером популяции, определяющим ее приспособленность к изменяющимся условиям внешней среды (см. главу 2). При этом каждая популяция характеризуется уникальным набором аллельных частот и различным сочетанием внешних провоцирующих факторов. Отсюда совершенно очевидно, что понятие **геногеографии наследственных болезней** [80] относится не только к моногенной патологии, но распространяется и на мультифакториальные (полигенные) заболевания

Цель главы — представить обзор современного состояния этих новых направлений современной медицины, показать их взаимосвязь, наметить перспективы развития.

7.1. НУТРИГЕНОМИКА

Введение

Подобно генетике (науке о генах) и геномике (науке о всем наследственном аппарате клетки), различают нутригенетику и нутригеномику, которые определяют как наследуемые индивидуальные различия реакции организма на пищу [633]. При этом **нутригенетика** исследует влияние генетических вариаций между диетой и заболеванием. Ее цель — оценить риск и пользу определенной диеты, ее отдельных компонентов для здоровья индивида, то есть разработать научные подходы индивидуального (персонифицированного) питания. **Нутригеномика** — понятие более емкое. Она исследует действие диеты не только на геном, но и на весь **протеом** (обмен белков) и **метаболизм** (метаболические системы всего организма). Ее главная задача — идентификация генетического полиморфизма, отвечающего за ген-диетные взаимодействия, дающего ключ к индивидуальным (персонифицированным) рекомендациям в отношении диеты.

Главные задачи нутригеномики:

- изучить, как влияет питание на метаболические процессы и гомеостатический контроль;
- выяснить, как эта регуляция изменяется на ранних стадиях болезней, ассоциированных с диетой;
- установить, в какой мере индивидуальные особенности генома связаны с патогенезом заболевания.

Своими корнями нутригеномика уходит в далекое прошлое. Еще 2400 лет назад Гиппократ сказал: «Пища будет вашим лекарством, и пища излечит вас» (“... food be your medicine and medicine be your food”). Ему же принадлежит известное высказывание о том, что именно с помощью правильно подобранной диеты, а не каких-то лекарств, хороший врач должен исцелять больного.

В 1900 году Арчибальд Гаррод — основоположник биохимической генетики — предположил, что диета по-разному влияет на разных индивидов. В 1956 году проф. Р. П. Вильямс (R. P. Williams) суммировал данные по нутригеномике в книге «Биохимическая индивидуаль-

ность», которая включала в себя главу «Индивидуальность в питании». Сам термин **нутригеномика** впервые появился в 1975 году в работе английского исследователя Р. О. Бреннана «Нутригенетика: новая концепция, облегчающая гипогликемию», в которой был впервые сформулирован тезис о том, что пища влияет на работу генов [342].

В 2004 году Дж. Капут и Р. Л. Родригес опубликовали статью «Нутритивная геномика: следующий этап постгеномной эры» [532], в которой привели 5 основных постулатов, определяющих данное научно-практическое направление:

- химические компоненты пищи прямо или косвенно влияют на геном человека, изменяя работу генов;
- в определенных условиях и при определенном генотипе диета может стать важным фактором риска (плохое питание — риск болезней);
- некоторые гены, регулируемые диетой, определяют частоту, прогрессию и тяжесть болезни (степень их влияния определяется особенностями индивидуального генома);
- индивидуальный геном определяет баланс между здоровьем и болезнью;
- с помощью диеты можно активно влиять на работу генов (персонализированное питание для профилактики и лечения хронических болезней).

Действительно, хорошо известно, что именно химические компоненты пищи, так называемые **нутриенты**, являются самыми древними модуляторами генной экспрессии. В частности, у прокариотов четко показана регуляция работы соответствующих оперонов при действии конкретного химического вещества (лактоза, гистидин, триптофан и пр.). У многоклеточных организмов такая регуляция сильно усложняется наличием многочисленных клеточных, гормональных, нейрональных, иммунных и других факторов, определяющих работу генов. Однако и у них многие нутриенты — жирные кислоты, витамины, моносахариды, аминокислоты, нуклеотиды — могут непосредственно воздействовать на **транскрипционные факторы (ТФ)**, вызывая экспрессию соответствующих генов, воздействуя на их цисрегуляторные элементы. Они могут действовать и опосредованно через гормоны: инсулин, глюкагон, глюкокортикоиды, тироксин и пр. [533].

Уместно напомнить, что несмотря на значительное генетическое сходство всех жителей планеты вида *Homo sapiens* (см. главу 1), генетическая уникальность каждого индивида весьма значительна. Согласно

обобщенным данным, основная часть генетических различий (93–95 %) в виде однонуклеотидных замен приходится именно на внутрипопуляционное разнообразие, а генетические различия между большими популяционными группами составляют не более 3–5 % [452].

Таким образом, основные генетические различия касаются уникальных особенностей генома каждого индивида. Они являются реальной материальной основой неповторимой **биохимической индивидуальности** человека, определяющей не только его наследственную предрасположенность к различным заболеваниям, но и реакцию на различные внешние воздействия, в том числе и на химические компоненты пищи.

Нутригеномика, как наука об индивидуальной реакции организма на пищевые факторы, уже доказала свою полезность при лечении и профилактике многих заболеваний. Однако, в отличие от моногенной патологии, при которой тяжелые мутации напрямую определяют высокую вероятность заболевания, генетический полиморфизм, широко представленный в популяции, только модулирует конечный фенотипический эффект. Как правило, аллельные варианты имеют сравнительно слабый эффект на уровне индивида, но могут оказывать существенное влияние на популяционный риск заболевания. Во многих странах начато специальное популяционное тестирование генетического полиморфизма с целью создания национальных банков данных, позволяющих проводить масштабные исследования для оценки влияния внешних факторов, в том числе и питания, на здоровье нации.

Национальные базы генетических данных уже имеются в Исландии (Iseland Health Sector Database), Великобритании (Biobank UK), Эстонии (Estonian Genome Project), США (Marshfield Personalized Medicine) [309].

Справедливости ради следует заметить, что нутригеномика как наука делает лишь первые шаги. Пока ученые, работающие в этой исключительно перспективной и интересной области, переосмысливают на уровне генов и их продуктов уже известные факты взаимодействия пищевых метаболитов как регуляторов генной экспрессии. На уровне генов и их продуктов подробно исследованы основные звенья метаболизма липидов, углеводов, минералов и витаминов. Детально изучены гены системы детоксикации ксенобиотиков. Созданы подробные генетические карты многих сложных морфогенетических процессов, ведется активный поиск генов, ассоциированных с различными хроническими заболеваниями.

Между тем взаимодействия диеты и генов пока хорошо охарактеризованы на уровне генов и белков только при ряде моногенных заболеваний: непереносимость лактозы, фенилкетонурия, галактоземия, семейная гиперхолестеринемия. При этих болезнях не только идентифицированы соответствующие гены, но и охарактеризован спектр основных мутаций. Значительно сложнее обстоит дело с такими полигенными болезнями, как диабет (см. раздел 6.3), сердечно-сосудистые заболевания (см. раздел 6.5), остеопороз (см. раздел 6.2), ожирение и др. Уже существующие новые технологии — микрочипы, поиск общегеномных ассоциаций с помощью карт гаплоидного генома (Genome Wide Association Studies — GWAS) [766], наконец, возможность получать протеомные и метаболомные профили, создание эпигенетических карт функционирующего генома в разных тканях человека и на разных стадиях онтогенеза позволяют надеяться на быстрый прогресс нутригеномики уже в близком будущем.

Актуальность исследований по нутригеномике не вызывает сомнения. Достаточно напомнить, что, согласно данным ВОЗ, в 2003 году причиной смерти в 30 % случаев были ССЗ и к 2010 году они станут главной причиной смертности населения земли. В 1998 году тучность была признана ВОЗ эпидемией XXI века. Уже тогда 1 миллиард людей планеты имел индекс массы тела более 25 кг/м^2 , а у 300 млн человек он превысил 30 кг/м^2 . По некоторым прогнозам, число тучных людей к 2030 году удвоится. Генетически детерминированы такие болезни, напрямую связанные с диетой, как коронарная болезнь сердца (КБС), гипертония, диабет, ожирение, остеопороз. Считается, что пищевые факторы ответственны примерно за 30 % всех раков, число которых прогрессивно возрастает, главным образом за счет увеличения числа пожилых людей. Как показали исследования близнецов, в возрасте 75 лет в 11–18 % случаев у них отмечается дискордантность в отношении колоректального рака, рака простаты и молочной железы. То есть, несмотря на идентичный геном, даже у близнецов по мере старения возникают заметные эпигенетические различия, обусловленные действием экзогенных, в том числе и пищевых, факторов. Можно ли и в каком объеме уже сейчас подобрать человеку индивидуальную, оптимальную для его генома диету? А если нет, что же тогда возможно в современной нутригеномике? Ответам на эти и другие вопросы, связанные с проблемой ген-диетных взаимодействий и посвящена данная глава.

7.1.1. Нутригеномика и болезни

Более 10 лет назад было установлено, что дефицит фолиевой кислоты может быть причиной 70 % дефектов зародка нервной трубки. Кроме того, было установлено, что такой дефицит способствует развитию коронарной болезни сердца, различным формам патологии беременности, некоторым формам рака и даже нарушениям умственной деятельности. Известно также, что около 100 генов прямо или косвенно вовлечены в метаболизм фолатов. При этом главный повреждающий эффект, по-видимому, определяется гипергомоцистеинемией, возникающей вследствие нарушения процесса деметилирования гомоцистеина в метионин, в результате дефицита метаболически активной формы фолиевой кислоты (тетрагидрофолиевой кислоты) [757].

Проблемы нутригеномики особенно подробно изучены в отношении сахарного диабета 1-го и 2-го типов (см. раздел 6.3). Результаты многолетних наблюдений и генетических исследований, проведенных в Финляндии, указывают на то, что доля лиц с высоким риском СД1 по генам локуса *HLA* снизилась на 20 %, при этом существенно возросла доля лиц с «протективным» *HLA*-генотипом (см. выше). Однако, вопреки ожиданиям, за последние 30 лет в стране резко увеличилась частота СД1. Естественно предположение, что такой подъем заболеваемости СД1 определяется действием каких-то неблагоприятных внешних факторов.

Среди наиболее вероятных факторов, принимающих участие в запуске процессов разрушения островковых клеток поджелудочной железы, в настоящее время выделяют следующие: 1) латентно протекающие вирусные инфекции, вызывающие иммунную реакцию (коксаки, краснуха) или лизис β -клетки (паротит); 2) химические агенты и токсины, разрушающие β -клетки (нитрозамины, содержащиеся в некоторых пищевых продуктах, стрептозотозин и др.); 3) факторы питания (раннее употребление коровьего молока); 4) некоторые психоэмоциональные реакции, например стресс.

Установлено также, что частота СД1 находится в прямой зависимости от энергетической ценности диеты и в обратной — от доли растительной пищи в ежедневном рационе человека. На основании анализа уже имеющихся мировых данных основные пищевые продукты по степени их риска для развития СД1 подразделены в порядке снижения значимости на 3 основные группы: молоко и молочные продукты, мясо, крупы. Особенно большое значение в плане профилактики СД1

придают питанию ребенка в первые годы жизни. Обращено внимание на выраженный протективный эффект в отношении СД1 материнского молока, что позволяет настоятельно рекомендовать его использование в период перевода ребенка на различные питательные смеси. Таким образом, именно нутригеномике сегодня принадлежит решающая роль в первичной профилактике СД1.

Не менее важен потенциальный вклад нутригеномики в профилактику и лечение СД2. Известно, что у одних больных СД2 легко корректируется диетой, изменением образа жизни или назначением тех или иных фармпрепаратов. У других такое лечение оказывается малоэффективным.

Логично предполагать, что у каждого больного, особенно на ранних стадиях СД2, в определенной мере будет страдать та или другая генетически и, соответственно, функционально наиболее ослабленная метаболическая система. Поэтому своевременное выявление генетически слабого звена — необходимое условие правильно организованной персонифицированной лекарственной и диетотерапии СД2 [390].

Таким образом, как и в случае СД1, система профилактики СД2 должна начинаться с тестирования аллельных вариантов генов предрасположенности с целью отбора лиц групп высокого риска и их последующего научно обоснованного мониторинга. Определенная сложность в отношении СД2 заключается в его большой генетической размытости. Поэтому, учитывая сравнительно высокую частоту семейных случаев СД2, логично уже на первом этапе провести генетическое тестирование больного в семье высокого риска СД2, определить у него наиболее вероятные сочетания неблагоприятных аллелей и только затем тестировать соответствующие генетические маркеры у других членов семьи, в том числе и у детей.

На этом основании вполне оправданно широкое использование уже имеющихся данных по генетике СД1 и СД2 для профилактики и лечения этих тяжелых заболеваний. Важную роль в их лечении, особенно СД2, принадлежит нутригеномике, которая предоставляет большие возможности для улучшения качества жизни путем прогностического тестирования генов, ассоциированных с определенными компонентами пищи. Необходимы дальнейшие масштабные исследования взаимодействий «ген–диета–заболевание» в условиях международного сотрудничества и на различных популяциях для разработки более детальных программ персонифицированных диетотерапий для больных СД2.

Любые изменения в режиме и качестве питания зачастую неблагоприятно влияют на здоровье. Так, отмечено, что изменения структуры питания в Китае и Японии в последние годы спровоцировало в этих странах, ранее считавшихся устойчивыми к сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ), их рост, прежде всего КБС. Рост числа ССЗ отмечен также у иммигрантов, переехавших в США из Японии и Китая [502].

Интересные наблюдения сделаны и в отношении таких вредных привычек, как курение и употребление алкоголя. На основании мета-анализа 14 обширных работ установлено, что курение удваивает риск КБС, нарушает целостность эндотелия сосудов, увеличивает синтез молекул адгезии, нарушает метаболизм липидов, вызывает воспалительные реакции, увеличивает риск тромбоза. Само курение увеличивает риск КБС в среднем в 1,94 раза (95 %). При этом в случае генотипа *ApoE2/E3* риск КБС возрастает в 1,64 раза, а у лиц с неблагоприятным генотипом *ApoE4/E4* — в 3 раза. Такой синергический эффект курения и аллелей *E* гена *APO* объясняется их влиянием на скорость окисления липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), способствующих развитию атеросклероза и некоторых нейродегенеративных заболеваний [502].

Мета-анализ популяционных исследований действия алкоголя позволил прийти к достаточно неожиданному выводу: алкоголь в малых дозах (50 мл крепкого напитка или бокал вина ежедневно) оказывает протективный эффект в отношении ССЗ за счет повышения в крови уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), но тот же алкоголь в более серьезных дозах и при более частом употреблении провоцирует развитие КБС. Определенный защитный эффект от этого серьезного заболевания имеют носители аллеля $\gamma 2$ гена алкогольдегидрогеназы 3 (*ADH3*), особенно при наличии его в гомозиготном состоянии.

7.1.2. Нутригеномика, болезни и полиморфизм генов

Научная информация, касающаяся проблем генетического тестирования наследственной предрасположенности к различным мультифакториальным заболеваниям, а также вопросов нутригеномики стремительно увеличивается. Уже к 2001 году был проведен мета-анализ 36 генетических ассоциаций, включающий такие частые заболевания как КБС, диабет, гипертония, различные онкологические заболевания, и др. [523]. К сожалению, серьезным недостатком большинства работ по генетическому тестированию были малые выборки и неточность

диагноза (отбор фенотипов!). Выявленные ассоциации растворяются при обобщении данных, полученных на разных популяциях и на разных группах населения. Более объективные данные результатов генетического тестирования могут быть получены с помощью мета-анализа работ, выполненных в разных лабораториях. Эффективным методом идентификации генов-кандидатов мультифакториальной патологии является общегеномный скрининг ассоциаций на больших группах здоровых и больных индивидов с использованием программы НарМар [766] (см. раздел 6.3).

Пока получены сведения о сравнительно небольшом числе генов и их ассоциации с болезнями в разных популяциях. Так, уже упоминавшийся ген обмена липопротеинов *APOE4* ассоциирован с высоким уровнем ЛПНП и холестерина у представителей разных популяций (носители *APOE4* имеют высокий уровень «плохих» липидов (ЛПНП) в сравнении с другими аллелями этого гена). Данный аллель является главным компонентом триглицерид-богатых липопротеинов, которые действуют как лиганды некоторых мембранных рецепторов, определяющих клиренс липопротеинов из плазмы крови. Аллель *APOE4* в североевропейских странах встречается вдвое чаще, чем в южных. Соответственно, именно у жителей этих стран ССЗ встречаются почти вдвое чаще, чем у жителей южных регионов [502].

До недавнего времени все проблемы сердечно-сосудистых заболеваний относили на счет неблагоприятных внешних воздействий. Основные из них: диета, алкоголь, курение, физическая активность. Сейчас известно, в общей сложности, около 177 факторов риска ССЗ. Из них 33 составляют пищевые факторы, 35 — факторы, выявляемые лабораторными тестами, 34 относят к лекарствам, 33 представляют собой клинические симптомы и признаки, ассоциированные с высокой частотой ССЗ, и только 5 приходится на наследственные факторы [641].

Проведен мета-анализ 74 статей по исследованию липидного обмена в группах различного генотипа. На 1020 мужчинах и 1110 женщинах из трех разных этнических групп в исследованиях по программе «Фрамингхам» [640] показана ассоциация ССЗ с полиморфизмом генов *APOA1*, *APOAIV*, *APOB*, *APOE*, а также с печеночной липазой (LIPC). Многочисленные лекарственные препараты, а также специальные диеты, обогащенные антиатерогенными ненасыщенными жирными кислотами (OMEGA-3), широко используются для снижения уровня холестерина и ЛПНП крови.

7.1.3. Нутриенты, болезни и гены

Польза ненасыщенных жирных кислот (OMEGA-3), содержащихся преимущественно в морской рыбе, доказана при псориазе, СД1, астме. В пользу ее свидетельствует и практически полное отсутствие рассеянного склероза у эскимосов Гренландии и у японцев. Установлено, что препарат OMEGA-3 снижает продукцию простагландина E2, тромбксана, уровень лейкотриена B4, уменьшает содержание триглицеридов и вследствие этого благотворно влияет на давление и свертывание крови, ослабляет воспалительную реакцию, предохраняет от атеросклероза.

Большое значение в нутригеномике придают витаминам. Интерес к этим нутриентам особенно возрос в последнее время, когда стало известно, что многие из них являются активными регуляторами генной экспрессии [641].

Существующие глобальные подходы к оценке функции генома позволяют понять механизмы действия на генном уровне многих витаминов. Дефициты фолиевой кислоты, цинка, витамина B₁₂, ниацина существенно увеличивают частоту хромосомных aberrаций и рассматриваются как фактор предрасположенности к метаплазии. Увеличение дозы соответствующих витаминов в пищевых продуктах может компенсировать этот дефект. Следует учитывать, однако, что вследствие полиморфизма генов, кодирующих соответствующие ферменты, индивидуальные потребности в определенных витаминах могут существенно варьировать. Так, вследствие мутации T677C в гене *MTHFR* активность фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, восстанавливающей фолиевую кислоту в ее метаболически активную форму (тетрагидрофолиевую кислоту), существенно снижается. Примерно 10% населения Европы гомозиготны по этой мутации (полиморфизму). Именно у них дефицит фолатов возникает особенно часто. Таким индивидам показано назначение дополнительных доз фолиевой кислоты. Прежде всего это относится к женщинам, планирующим ребенка или находящимся на ранних сроках беременности (см. раздел 6.7.2). Учитывая пищевую ценность фолиевой кислоты, в целях массовой профилактики ее дефицита в США с 1998 года ее добавляют в муку.

Жирные кислоты, холестерин, глюкоза, жирорастворимые витамины действуют на геном через факторы транскрипции, чувствительные к нутриентам. Это так называемые регуляторные рецепторные белки, связывающие стеролы (SREBs) и углеводы (ChREBP), а также ядерные рецепторы. Они играют большую роль в метаболических путях холестерина, липидов и углеводов, столь важных в патогенезе многих мульт-

тифакторных заболеваний. При этом рецепторы стеролов (SREBs) регулируют активность примерно 30 генов. Рецепторы ChREBP регулируют метаболизм углеводов и генов, связанных с превращением углеводов в триглицериды. Ядерные рецепторы прямо или косвенно регулируют экспрессию генов, вовлеченных в липидный обмен. Это многочисленное суперсемейство насчитывает свыше 48 ТФ, включает в себя классические стероидные и минералокортикоидные рецепторы, которые регулируются различными гормонами. Жирные кислоты активируют транскрипцию ядерных рецепторов печеночных клеток (HNF4 — hepatocyte nuclear factor 4), которые контролируют экспрессию всех аполипопротеиновых генов, а также синтез ферментов углеводного обмена, желчных кислот, секрецию инсулина и ряда цитохромов.

Некоторые устоявшиеся положения нутригеномики в отношении основных компонентов диеты сводятся к следующим.

1. **ЖИРЫ.** Пока мало клинических данных, что само по себе содержание жира в диете ассоциировано с риском КБС. Вместе с тем известно, что снижение в пище красного мяса оказывает положительный эффект на частоту рака простаты и груди. Нет сомнения в пользе замены животных жиров, богатых насыщенными жирными кислотами, на рыбные (OMEGA-3) и растительные продукты (соя), богатые ненасыщенными жирными кислотами.
2. **УГЛЕВОДЫ** в виде зерна и каши широко рекомендуются для профилактики диабета и КБС. Содержащееся в помидорах вещество **ликопен** снижает риск рака простаты. Углеводы, содержащиеся во фруктах, уменьшают частоту рака, снижают давление и уровень калия, предохраняют от ССЗ.
3. **МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ** богаты кальцием, повышают риск рака простаты. Отмечена, однако, обратная зависимость между уровнем потребления кальция и давлением. Снижение кальция ассоциировано с раком толстой кишки (оптимум — 800 мг в день).
4. **СОЛИ.** Снижение уровня соли до 3 г в день вместо обычных 8–10 г/день благотворно сказывается на артериальном давлении и на 22 % уменьшает риск возникновения инсульта и на 16 % частоту КБС.
5. **АЛКОГОЛЬ.** 50 г крепкого алкоголя в день снижают вероятность инфаркта на 30–40 %. Благотворно сказывается на здоровье умеренное употребление не только красного, но и любого вина в связи с его антиоксидантным действием. Но и здесь важен генотип. Так, отмечена обратная зависимость между потреблением алкоголя и

инфарктом миокарда (ИМ) у лиц с медленной формой алкогольдегидрогеназы. Прямая корреляция отмечена между употреблением алкоголя и раком молочной железы, что, как предполагают, объясняется потенцирующим действием алкоголя на синтез эстрогенов.

Суммируя эмпирические данные и результаты многочисленных исследований по нутригеномике ССЗ, можно отметить, что сниженный на 80 % риск ССЗ характерен для индивидов, которые не курят, имеют индекс массы тела в пределах 25 кг/м^2 , физически активны не менее 30 минут в день, придерживаются хорошо сбалансированной диеты, содержащей много ненасыщенных жирных кислот, крупы, морскую рыбу (дважды в неделю), большие дозы фолиевой кислоты, умеренно, но регулярно употребляют алкоголь.

В плане предупреждения онкологических заболеваний, помимо ранее отмеченных факторов, онкогенетики большое внимание сегодня обращается на метилирование ДНК и анализ эпигенетических механизмов изменений гетерохроматина. Понимание этих процессов позволит разработать диеты и найти эффективные лекарства, которые будут препятствовать эпигенетической репрессии промоторных районов генов онкосупрессоров.

7.1.4. Ген-диетные взаимодействия

Каждый пищевой продукт растительного или животного происхождения представляет собой смесь различных химических веществ (нутриентов), специфичных по своему химическому составу и биомеханизму действия. Многие из них являются биологически активными веществами (витамины, белки, соли, фитогормоны, гликозиды, полисахариды и пр.), некоторые из них по своему действию перекрываются в метаболических цепях с лекарственными препаратами. В настоящее время становится очевидным, что грань между диетотерапией и лекарственной терапией весьма условна. Правильнее говорить, что в пище содержится множество лекарств. Как компоненты пищи, так и лекарства, попадая в организм, подвергаются химическому расщеплению, активации, детоксикации и выведению. Все эти этапы обеспечиваются соответствующими ферментами, синтез которых контролируется многочисленными генами и целыми семействами генов — генными сетями (см. главу 3). Наличие аллельных (полиморфных) вариантов каждого гена существенно модулирует биохимический (ферментный) профиль, который, в конечном счете, и определяет особенности индивидуальной

чувствительности каждого человека к пищевым продуктам и фармпрепаратам. Следовательно, пути нутригеномики тесно переплетаются с путями фармакогеномики, как переплетаются гены и болезни. Нутригеномное тестирование зачастую комплементарно фармакогеномному. Подобно фармпрепаратам, нутриенты взаимодействуют со всеми метаболическими системами организма.

При изучении ген-диетных взаимодействий следует учитывать многообразие реакций, происходящих во всех метаболических системах на всех иерархических уровнях организма. На клеточном уровне они включают зависимость эффекта от аллельного варианта гена-маркера, ген-генные взаимодействия, взаимодействия между белками, белками-генами, РНК-белками или РНК-генами (специфическое исключение гена малыми РНК (см. главу 1). Сложность метаболических систем, иерархичность их организации, опосредованные, а нередко комплементарные (эпистатичные) функции многих генов существенно затрудняют тонкий анализ ген-диетных взаимодействий, прежде всего, понимание роли отдельных генов и их полиморфных вариантов в метаболизме нутриентов и фармпрепаратов. Тем не менее масштабные исследования по нутригеномике уже позволили идентифицировать многие гены, аллельные варианты которых ассоциированы с частыми заболеваниями человека (диабет, ожирение, ССЗ, остеопороз и др.). Экспрессия некоторых из них уже сегодня может быть эффективно скорректирована с помощью диеты и лекарственной терапии.

Помимо хорошо изученного обмена липидов, примером углубленного изучения ген-диетных взаимодействий может быть процесс ремоделирования хроматина, который, как сегодня считается, играет важную роль не только в процессах онкогенеза, но представляет собой достаточно универсальный механизм регуляции генной активности. Ее биохимическую основу составляет метилирование ДНК, метилирование и ацетилирование гистонов.

Метилирование зависит от диеты и регулируется особыми ферментами — ДНК-метилтрансферазами [156]. Последние переносят метильные группы от S-аденозилметионина на цитозин. Дефицит таких важных нутриентов, как холин, метионин, фолаты, витамины B₆ и B₁₂ влияет на ДНК, метилирование и увеличивает риск врожденных дефектов зародка нервной трубки, рака и ССЗ.

В настоящее время разрабатываются пути направленного изменения метилирования ДНК хроматина и гистонов. Особенно большие надежды

в этом отношении возлагают на естественные нутриенты и синтезированные на их основе лекарственные препараты, являющиеся специфическими ингибиторами ферментов метилирования (метилаз) [533].

Ремоделирование хроматина определяется энергетическим балансом клетки и, в первую очередь, изменениями соотношения восстановленной и окисленной форм никотинамиддинуклеотида (NADH/NAD⁺), активностью гена *SIRT1* и NAD⁺-зависимой деацетилазы гистонов. Особое значение в этих процессах придают генам семейства сиртуинов, играющих важную роль в процессах старения организма (см. раздел 7.3).

Известно, что продукт гена *SIRT1* связывается с ядерным рецептором NCoR и угнетает активность медиаторов рецепторов тиреоидного гормона и ретиноевой кислоты (SMRT), а также транскрипционного фактора PPAR γ (рецептор пероксисомной пролиферации) — ключевого регулятора обмена жиров (липидов) в адипоцитах. Отсюда предполагается, что, активируя ген *SIRT1* и, соответственно, угнетая экспрессию гена PPAR γ , можно нормализовать обмен веществ и замедлить процессы старения [533]. Активация гена *SIRT1* может быть достигнута различными нутриентами, в том числе красным вином, содержащим препарат резвератрол (см. раздел 7.3), либо препаратом, выделенным из соевых бобов, — луназином [632]. Длительное воздействие эпигенетических факторов может изменить структуру хроматина, его эпигенетический профиль (эпигеном). Результаты этих и многих других исследований позволили сформулировать гипотезу о том, что, изменяя структуру хромосом с помощью нутриентов, биологически активных веществ, других экзогенных факторов [632], а также воздействуя на промоторные области генов, например с помощью цитаминнов [539] или других внешних факторов, можно направленно регулировать экспрессию генов.

Вместе с тем диеты и пищевые факторы могут непосредственно влиять на активность белков и ферментов. При этом изменения в молекулярной структуре белков, обусловленные полиморфизмом соответствующих генов, могут менять сродство пищевого лиганда (коэнзима) к белку, делая фермент функционально менее активным [632].

Установлено также, что некоторые классы генов более значимы для нутригеномики, чем другие. Так, гены рецепторов или гены метаболических сигналов (гены сигнальной трансдукции) в своем большинстве более важны для регуляции метаболических процессов, чем гены отдельных ферментов [532]. В этом отношении они вполне соответствуют

генам предрасположенности к мультифакториальным болезням [30]. Например, эпигаллокатехин галлат (EGCG), биоактивный нутриент зеленого чая, модулирует сигналы трансдукции, регулирующие рост опухолевых клеток [479]. Фитоэстрогены, как и другие полифенолы фруктов и овощей, воздействуя на соответствующие рецепторы, оказывают противовоспалительное, антиоксидантное и противоопухолевое действие [460]. Многие нутриенты являются лигандами различных ТФ, реализуя свой эффект через рецепторы печени и пероксисом, регулируют обмен липидов, иммунный ответ и воспалительные реакции.

Все эти сложные ген-диетные взаимодействия вначале были установлены в результате кропотливых комплексных исследований на культурах клеток и биологических моделях (экспериментальных животных) и лишь затем детально изучены у человека.

В качестве модельных объектов нутригеномики широко используются различные лабораторные животные. Особенно удобны для этих целей лабораторные мыши и крысы, геномы которых секвенированы и обнаруживают в генах 99%-ю гомологию с геномом человека. Например, для изучения ожирения и диабета 2-го типа удобной моделью являются мыши *A/a agouti* (норма) и *A^{vy}/A* (*obese yellow*). Использование таких мышей позволяет изучить влияние диеты на экспрессию генов. Именно на таких мышах были идентифицированы 28 генов-маркеров, ассоциированных с диабетом, 8 из которых ассоциированы с СД2 человека [634].

Исследования по нутригеномике непосредственно на человеке, как правило, ограничиваются поиском генов-маркеров и анализом генных ассоциаций в группах пациентов с соответствующей патологией (диабет, атеросклероз и пр.) либо изучением белковых продуктов таких генов у лиц, находящихся на специальной диете с точно известным содержанием определенных нутриентов. Зачастую такие исследования не дают однозначных результатов. Статистически значимые ассоциации регистрируются лишь в пределах отдельных популяций, но они становятся менее отчетливыми или даже исчезают при объединении результатов, полученных на разных популяциях и разных этнических группах.

Конструктивными для изучения ген-диетных взаимодействий оказались исследования единичных функционально значимых аллельных вариантов на пациентах с четко установленным диагнозом. Так была исследована концентрация ЛПВП в условиях полиморфизма $-75G/A$ гена *APOA1*, продукт которого взаимодействует только с одним нутриентом — полиненасыщенными жирными кислотами [390]. Однако и

такие исследования не дали однозначных результатов [640]. Считается поэтому, что значимыми для нутригеномики могут быть только **обширные эпидемиологические исследования, выполненные с тщательным отбором контингента обследуемых и адекватным статистическим анализом полученных результатов.**

Еще одним фактором повышения эффективности оценки ген-диетных взаимодействий человека является **выбор четко регистрируемого биомаркера (фенотипа).** Ассоциацию того или иного полиморфизма следует относить не к болезни вообще, то есть ориентировать не на диагноз заболевания, а привязывать биомаркер к какому-то конкретному, четко регистрируемому признаку или симптому заболевания (величина давления, уровень липидов, толщина сосудистой стенки и пр.).

С целью уменьшения потока ложноположительных результатов назрела необходимость разработать и внедрить в практику нутригеномных исследований **специальный справочник-путеводитель, позволяющий унифицировать методику тестирования ген-диетных взаимодействий.** Только наличие такого единого подхода может предотвратить насыщение научной литературы случайными и малодостоверными данными. Необходимо разработать и внедрить методы сертификации результатов клинического тестирования нутриентов.

7.1.5. Нутригеномика сегодня

Несмотря на большой скептицизм и понятную осторожность, нутригеномика все активнее вторгается в жизнь. Начиная с 2000 года в научной печати, по данным PubMed, отмечается резкий подъем числа работ по взаимодействию генов с диетой (нутриентами). Уже сегодня с помощью генетического тестирования можно получить достаточно полную информацию о состоянии генов-маркеров системы детоксикации, липидного обмена, обмена углеводов, костной и соединительной тканей, иммунной системы, генов старения (см. главу 6). Генетическое тестирование с успехом применяется для выявления лиц с повышенной потребностью в некоторых витаминах [254] или лиц, нуждающихся в определенной диете [546]. Некоторые достаточно устоявшиеся и подтвержденные многочисленными наблюдениями генетические тесты уже используются в современной практической нутригеномике. Их описание приведено в популярной книге профессора Е. В. Барановой «ДНК: знакомство с собой, или как продлить молодость» [44]. Там же приведены варианты рационального питания в зависимости от полиморфизма генов.

Следует оговориться, что, учитывая сложность биохимических реакций пищи с мембранами клеток, с сывороточными белками, их сложный внутриклеточный метаболизм с образованием активных побочных продуктов, точные индивидуальные предиктивные тесты в нутригеномике скоро не появятся. Однако **нутригеномика уже сегодня в состоянии помочь человеку жить в гармонии со своими генами**. Эра биомаркеров генотип-фенотип уже началась и, конечно, приведет нутригеномику из лаборатории в клинику [390]. В частности уже сегодня в ряде стран (Голландия) — в семьях с повышенным риском целиакии новорожденных тестируют на наличие генов предрасположенности к этому заболеванию с целью разработки оптимального алгоритма снижения токсического действия глютена на организм ребенка [http://www.preventceliacdisease.com/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=42].

Заключение

Несмотря на обширные исследования и огромный багаж накопленной информации, исследования по нутригеномике все еще находятся в начале пути. Растущая популярность предиктивного тестирования в области нутригеномики постоянно стимулирует появление новых нутритестов. Однако очевидно, что пока не понятны сложные взаимодействия между диетой и генами, нутригеномика будет оставаться в области надежд, а не реальной практики [390]. Необходима следующая генерация обширных популяционных исследований для получения более объективных данных о ген-диетных взаимодействиях. Отсутствие обширных проспективных популяционных исследований с правильно подобранными и обработанными клиническими, лабораторными и генетическими данными сдерживает практическое внедрение нутригеномики. Современные технологии биочипов, анализ экспрессионного профиля тысяч генов в ответ на ту или иную диету, эффективный метод общегеномного поиска ассоциаций и, наконец, набирающая силу биоинформатика дают основания считать, что золотой век нутригеномики не за горами. Что же для этого необходимо?

Геномика питания требует нового, более четкого определения пищевого продукта — нутриента.

Чтобы знать, как действует пища и ее компоненты на геном и его функции, необходимы точные сведения о составе пищи, ее биомаркерах.

Важно понять качественные и количественные изменения метаболизма при действии разных продуктов питания на фоне разного генотипа.

Для этого необходимо спроектировать полиморфизм генов на **метабомику**, то есть изучить метаболические профили с помощью технологий, позволяющих определять глобальные количественные изменения метаболизма [594]. Последние включают в себя **спектральный ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрический анализ и жидкостную хроматографию**. Они позволяют одновременно проводить качественные и количественные исследования всех метаболитов даже в очень сложных биообразцах. Предполагается, что таким путем удастся выделить существенные и несущественные пищевые ингредиенты и определить их влияние на эндогенный метаболизм; оценить эффект пищевой интервенции на метаболические реакции в плане здоровья, заболевания, старения; определить возможные метаболические траектории с учетом отдаленных последствий пищевых воздействий; понять природу метаболического стресса и его индивидуально переносимые границы.

Очевидно, что уже в ближайшем будущем резко возрастет потребность практического здравоохранения в уникальных специалистах, разбирающихся в геномике и диетологии и способных растолковывать результаты нутригеномных тестов.

Такие специалисты-**интерпретаторы** будут незаменимы при разработке и внедрении в медицинскую практику геномориентированных продуктов, появление которых можно ожидать уже в недалеком будущем. Например, продукты для профилактики СД2 при наличии субфенотипа гиперинсулинемии или диета при наследственной инсулинорезистентности, выявляемой в результате генетического тестирования наследственной предрасположенности. Нет сомнения в том, что дальнейшее развитие нутригеномики, направленное на выяснение особенностей ген-диетных взаимодействий с учетом возраста человека и особенностей его генома, будет всемерно способствовать профилактике МФЗ, удлинению периода активного долголетия.

7.2. ФАРМАКОГЕНЕТИКА

Введение

Фармакогенетика — наука о генетически обусловленной индивидуальной реакции организма на лекарство. Ее основные концептуальные положения базируются на неоднократно упоминавшихся в предыдущих главах принципах генетического разнообразия человека, связанных с наличием генетического полиморфизма. В зависимости от

индивидуальных особенностей генома различные индивиды могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам и лекарственным препаратам [530]. Большинство ксенобиотиков, попадая в организм, не оказывают прямого биологического эффекта и подвергаются различным превращениям, так называемой биотрансформации, то есть серии метаболических реакций, после чего выводятся из организма [30, 126, 127]. Реакции биотрансформации контролируются специальными ферментами системы детоксикации. Наследственные изменения активности таких ферментов и/или несбалансированность в их работе, обусловленные генетическим полиморфизмом, приводят к неадекватной реакции организма на различные ксенобиотики. Следствием этого могут быть нежелательные побочные реакции либо отсутствие терапевтического эффекта при приеме лекарственных средств. **Наличие точных данных о химической структуре лекарства, биомеханизме его действия, а также о ферментных системах, контролирующих этот процесс, дополненных сведениями о строении соответствующих генов, способствует быстрому прогрессу фармакогенетики как одному из наиболее продвинутых разделов молекулярной медицины.** Более того, выявление ассоциаций полиморфных вариантов генов с различной индивидуальной чувствительностью к лекарственным препаратам позволяет не только уточнить патогенез самого заболевания, но и разработать оптимальную стратегию лечения с учетом биохимической индивидуальности пациента.

Термин «**фармакогенетика**» предложен в 1957 году американским генетиком Арно Мотульским для обозначения научно-практического направления, возникшего на грани клинической фармакологии и медицинской генетики. За 50 лет своего существования фармакогенетика прошла путь от констатации случаев парадоксальных реакций на лекарственные препараты (1932–1960), их осмысления на основе индивидуального биохимического фингерпринта (1960–2000), научного объяснения на уровне генетического полиморфизма (2000–2003) до практического применения (табл. 7.2.1) [126, 127, 188]. Уместно отметить, что молекулярный анализ аллельных вариантов двух генов (*CYP2C9* и *VKORC1*) стал первым генетическим тестом, официально одобренным в августе 2007 года Комитетом FDA (Food & Drug Administration, USA) по тестированию индивидуальной чувствительности к антикоагулянту варфарину (см. главу 9).

Таблица 7.2.1

Основные исторические вехи становления фармакогенетики [30, 127]

Дата	Событие
1932	Описаны семейные случаи гемолитической анемии при применении примахина
1957	Признание генетической природы индивидуальной чувствительности к лекарствам (А. Мотульский, В. Калов)
1958	Введение термина «фармакогенетика» (Ф. Фогель)
1962	Издание первой книги по фармакогенетике (В. Калов)
1977	Установление генетической природы (полиморфизмом гена <i>CYP2D6</i>) скорости метаболизма противитуберкулезного препарата дебризохина
1980	Установление связи между токсичностью меркаптопурина и дефицитом фермента тиопуринтрансферазы
1987	Описание полиморфизма гена <i>CYP2C9</i>
1990	Исследование ассоциаций генетического полиморфизма с эффективностью лекарственной терапии
2000	Внедрение фармакогенетических тестов в клиническую практику
2004	Практическое применение первого фармбиочипа (одобрено FDA)
2007	Первый генетический тест на чувствительность к антикоагулянту варфарину (одобрено FDA)

Следует заметить, что созданный в последние годы союз молекулярной фармакологии и функциональной геномики привел к возникновению еще одного родственного научно-практического направления — **фармакогеномики**, основная цель которой — оптимизация направленного поиска новых препаратов, специфически действующих на определенные гены и их продукты. Однако, по мнению некоторых ученых, подразделение на фармакогенетику и фармакогеномику, скорее, условное и касается уточнения бимеханизмов действия лекарственных средств [126].

Наследственная индивидуальная чувствительность к лекарственным препаратам определяет такие основные характеристики любого лекарства, как **фармакокинетика** и **фармакодинамика**. Первая касается индивидуальных особенностей абсорбции, распределения, метаболизма и выведения лекарства, тогда как вторая направлена на изучение взаимоотношений между концентрацией препарата, местом его действия и терапевтическим эффектом [126]. Фармакокинетические механизмы определяются функциональными особенностями ферментов биотранс-

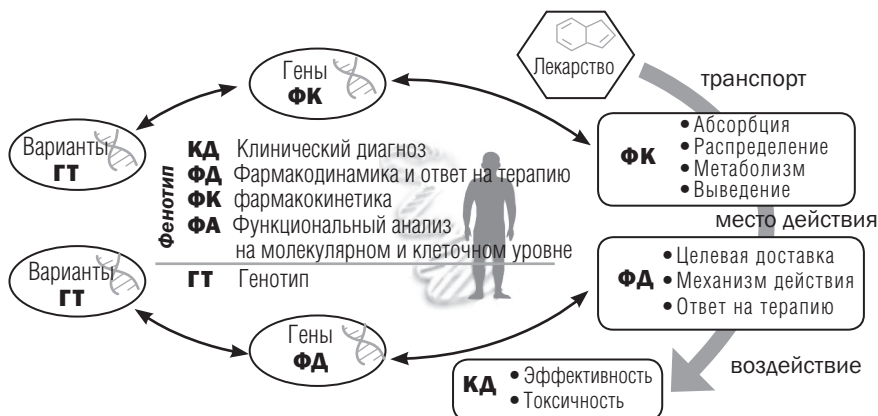


Рис. 7.2.1. Фенотипические эффекты лекарственных препаратов в зависимости от функции генов, влияющих на их фармакокинетику и фармакодинамику (<http://www.pharmgkb.org/>)

формации, транспортерами лекарств, ферментами системы выведения. Фармакодинамические характеристики зависят от состояния соответствующих мембранных и внутриклеточных рецепторов, ионных каналов, липопротеинов, ферментов-мишеней, факторов свертывания крови, белков клеточного процессинга и др. (рис. 7.2.1).

Таким образом, **основной задачей фармакогенетики является изучение аллельных вариантов генов, определяющих особенности индивидуальных фармакокинетических и фармакодинамических характеристик организма с целью оптимизации стратегии индивидуальной лекарственной терапии.**

7.2.1. Побочные нежелательные лекарственные реакции

Нежелательные лекарственные реакции — НЛР (нежелательные эффекты) являются одной из самых значительных медицинских проблем [127]. Смертность от них сопоставима со смертностью от болезней легких. У 4,7% поступивших в стационар больных НЛР являются непосредственной причиной госпитализации. По данным ВОЗ, в некоторых странах до 20% бюджета, направленного на медицинские нужды, расходуется на купирование НЛР [127]. Вследствие ошибок при назначении лекарств только в США за год погибает около 100 000 человек, а у 2,2 млн госпитализированных больных регистрируются реакции несовместимости с медикаментами [127].

Ошибки в назначении лекарств связаны с тремя основными факторами: неправильным выбором препарата и его дозировки, неадекватным состоянием больного или ошибочным выбором пути введения.

Хотя у большинства врачей НЛР ассоциируются с аллергическими реакциями, последние составляют не более 20% от общего их числа [127].

Наибольшему риску при приеме лекарств подвергаются пациенты с патологией печени и почек. Риск возрастает и при назначении нескольких лекарств, биотрансформация которых происходит при участии одних и тех же ферментов метаболизма. Особое значение следует уделять приему лекарств во время беременности.

В настоящее время генетическое исследование рассматривают как наиболее точный прогностический тест, позволяющий оценить особенности индивидуальной чувствительности до назначения лекарственной терапии. В первую очередь при этом обращают внимание на состояние генов системы биотрансформации/детоксикации.

7.2.2. Система биотрансформации

Биотрансформация/детоксикация всех ксенобиотиков (чужеродных веществ), в том числе любых лекарственных препаратов, попадающих в организм, обеспечивается сложной метаболической системой, представленной многочисленными группами ферментов, функционирующих по каскадному принципу [126]. Гены, контролирующие синтез соответствующих ферментов, ранее называли генами внешней среды (environmental genes) [30]. В настоящее время их объединяют под общим названием «гены метаболизма» [44]. В сложном процессе биотрансформации/детоксикации выделяют три последовательные фазы (см. рис. 6.1.4): I — **фаза активации** (называется также **фазой функционализации или модификации**) отвечает за комплекс биохимических реакций, в процессе которых ксенобиотики за счет освобождения активных групп (таких, как — OH, NH₂, SH) превращаются из липофильных в более гидрофильные соединения. В фазе II — **фазе нейтрализации** (называется также **фазой дезактивации и детоксикации**) на активированные продукты фазы I переносятся ацетильные, метильные, сульфгидрильные группы либо глутатион, в результате чего образуются гидрофильные конъюгаты. В III фазе происходит эвакуация продуктов детоксикации через легкие, почки, кишечник. Иногда выделяют еще 0-фазу, которая отвечает за препятствие всасывания ксенобиотиков в кишечнике (гликопротеин Р).

Фазу I биотрансформации обеспечивают такие ферменты, как цитохромы P450, дигидропиримидиндегидрогеназа, бутирилхолинэстераза, параксоназа, алкоголь- и альдегиддегидрогеназа и др. В процессе II фазы происходит глюкоронирование (УДФ-глюкоронилтрансферазы), ацетилирование (N-ацетилтрансферазы), S-метилирование (тиопурин-метилтрансфераза), сульфатирование (сульфотрансферазы), водная конъюгация (эпоксидгидролазы), конъюгация с глутатионом (глутатион-трансферазы). За выведение ксенобиотиков отвечают гликопротеин Р, белки-транспортёры органических анионов и катионов.

Важной особенностью системы биотрансформации является синхронность работы всех фаз и их взаимозависимость.

7.2.3. Гены и ферменты I фазы биотрансформации

Цитохромы P450

Суперсемейство цитохромов P-450 (CYP-450) отвечает за микросомальное окисление и представляет собой группу ферментов, имеющих множество изоформ (более 1000), которые не только осуществляют метаболизм лекарств, но и участвуют в синтезе стероидных гормонов, холестерина и других веществ. Наибольшее количество цитохромов обнаружено в гепатоцитах, а также в таких органах, как кишечник, почки, легкие, головной мозг, сердце [127]. Изоферменты цитохромов на основании гомологии нуклеотидной и аминокислотной последовательностей подразделяют на семейства, которые, в свою очередь, делят на подсемейства. Представители различных семейств отличаются субстратной специфичностью и регуляторами активности (индукторы и ингибиторы). Хотя отдельные члены семейств могут иметь «перекрестную» специфичность и «перекрестные» индукторы и ингибиторы [127]. Так, показано, что противовирусный препарат ритонавир метаболизируется семью ферментами (CYP1A1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), а циметидин ингибирует четыре фермента (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) [127]. Наиболее важными для биотрансформации лекарств являются цитохромы CYP1A1, CYP2A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5. Относительный вклад различных цитохромов и других ферментов I фазы детоксикации в метаболизме лекарств представлен на рисунке 7.2.2.

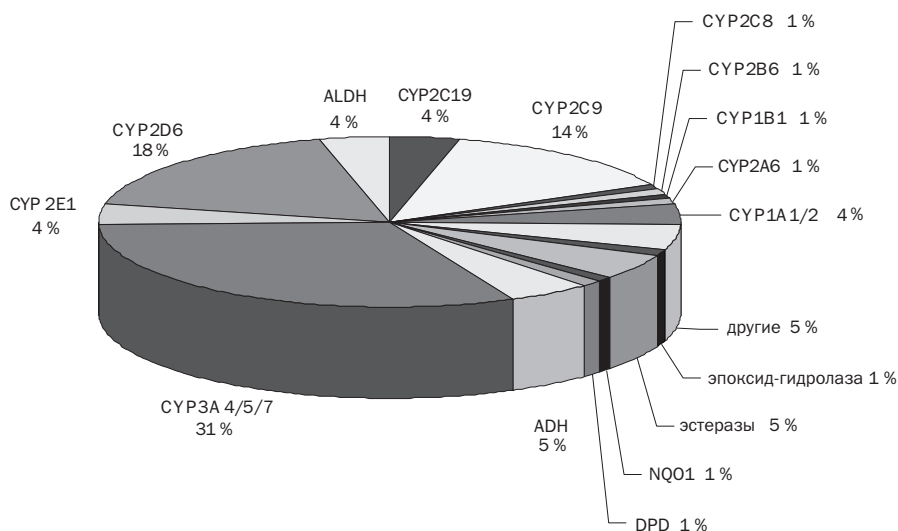


Рис. 7.2.2. Относительный вклад ферментов I фазы детоксикации в биотрансформацию лекарств

Каждый изофермент цитохрома Р-450 кодируется своим геном, которые локализуются на разных хромосомах. Часть таких генов имеет близко расположенные к ним псевдогены (неэкспрессирующиеся копии), которые существенно осложняют проведение генетического тестирования.

Вследствие полиморфизма генов метаболизма активность соответствующих ферментов у разных лиц может существенно варьировать. В зависимости от этих межиндивидуальных особенностей выделяют три группы лиц, различающихся по активности того или иного фермента метаболизма [126]. Это так называемые «экстенсивные» метаболизаторы — лица с нормальной скоростью метаболизма лекарств (основная часть популяции), «медленные» метаболизаторы (лица со сниженной скоростью метаболизма определенных лекарств) и «быстрые» («сверхактивные») метаболизаторы — индивиды с повышенной скоростью биотрансформации некоторых лекарств. Доля «медленных» и «быстрых» метаболизаторов по отдельным ферментам метаболизма обнаруживает существенные межпопуляционные различия. Вместе с тем далеко не всегда отмечается полная корреляция генотипа и фенотипа в скорости метаболизма лекарства, что свидетельствует о необходимости использования биохимического контроля при генотипировании ферментов метаболизма [188].

Рассмотрим функциональные особенности полиморфизма основных генов суперсемейств цитохромов CYP-450, принимающих участие в метаболизме лекарств. Подробную информацию о свойствах ферментов метаболизма, их субстратных характеристиках и генетическом полиморфизме можно найти в серии отечественных монографий и учебников по клинической фармакогенетике [126, 127, 188].

Семейство P-450 CYP1 метаболизирует сравнительно небольшую часть ксенобиотиков, самые важные из которых представлены полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) — основными компонентами табачного дыма. Особенно важная роль в этом принадлежит генам *CYP1A1* и *CYP1A2*, локализованным на хромосоме 15. Экспрессию обоих генов регулирует комплекс, образуемый Ah-рецептором с индуцирующей молекулой ПАУ, который проникает в ядро и специфически стимулирует экспрессию этих генов.

CYP1A1 кодирует белок с арилгидрокарбонат-гидроксилазной активностью, контролирующий начальный метаболизм ПАУ, приводящий к образованию канцерогенов (например, бензопирена, который образуется при табакокурении). Генный полиморфизм *CYP1A1* обусловлен тремя точковыми мутациями: C4887A и A4889G в экзоне 7 и T6235C в 3'-фланкирующей области. Замена G4889(Val)+C6235 характеризуется появлением «быстрого» аллеля *2B. Он обладает в 3 раза более высокой активностью по сравнению с аллелем дикого типа. *2B встречается почти у 7% представителей европеоидной расы и рассматривается как фактор риска рака легких. Показано, что при наличии *2B-аллеля у курильщиков риск развития рака легкого по сравнению с некурящими возрастает более чем в семь раз. Риск становится еще больше, если, кроме аллеля *2B гена *CYP1A1*, курящий индивид имеет также «неполноценный» аллель гена *GSTM1*. Аллели *2A (C6235) и *4 (A4887(Asp)) встречаются в популяции с частотой всего 1–3%. При этом *2A-аллель ассоциирован с наследственной предрасположенностью к лейкозу и резистентностью к лекарственной терапии этого заболевания [680].

Продукт гена *CYP1A2* метаболизирует не только ПАУ, но и такие соединения, как кофеин, теофиллин и др. Показано, что наличие *1A-аллеля гена *CYP1A2* тормозит метаболизм таких препаратов, как кофеин, дезепам, верапамил, метадон, теофиллин, эстрадиол.

Семейство P-450 CYP2 — представлено группой функционально наиболее значимых ферментов, метаболизирующих огромное количество различных препаратов. Их активность обнаруживает выраженную зависимость от генетического полиморфизма.

Подсемейство CYP2A является наиболее важным изоферментом данного подсемейства. Он участвует в превращении никотина в котинин, в гидроксилировании кумарина и циклофосамида, вносит вклад в метаболизм ритонавира, парацетамола и вальпроевой кислоты. CYP2A6 принимает участие в биоактивации компонентов табачного дыма — нитрозаминов, вызывающих рак легких [127]. Ген *CYP1A6* локализован на 19 хромосоме в локусе 19q13.2. В основном ген экспрессируется в печени. Показано, что аллель *4 гена *CYP1A6* является протективным, т. е. ассоциируется с меньшим риском возникновения рака легкого [127]. Наличие аллелей *2 и *3 ассоциировано со сниженным метаболизмом кумарина, что имеет значение при дозировании этого препарата из-за возможного гепатотоксического действия [127].

Подсемейство CYP2B. Все ферменты этого подсемейства индуцируются фенobarбиталом. Наиболее значимым ферментом является CYP2B6, который метаболизирует многие цитостатики (циклофосамид), противовирусные препараты (эфавиренц и невирапин), антидепрессанты (бупропион), анестетики (пропофол) и синтетические опиоиды (метадон), а также участвует в метаболизме эндогенных стероидов. Ген *CYP2B6* локализован в том же локусе, что и ген *CYP2A6*, экспрессируется преимущественно в печени. Наличие медленных аллелей гена *CYP2B6* (*2, *4, *5, *6) снижает скорость метаболизма противовирусных препаратов, что приводит к снижению клиренса и повышает риск осложнений со стороны ЦНС [127].

Подсемейство CYP2C играет ключевую роль в метаболизме многих лекарств. Общим свойством этих изоферментов является наличие 4-гидролазной активности в отношении противосудорожного препарата мефенитоина [127].

Особенно важным для клинической фармакогенетики является тестирование полиморфизма гена *CYP2C9*, локализованного в локусе 10q24. Ген экспрессируется преимущественно в печени, является главным метаболитом ингибиторов ангиотензиновых рецепторов (лозартана и ирберсартана). Его субстратами также являются антикоагулянты (варфарин), сахароснижающие препараты (глипизид), противосудорожные препараты (фенитоин, диазепам), антидепрессанты

(амитриптилин, кломипрамин, имипрамин), ингибиторы протонных помп (омепразол), нестероидные противовоспалительные препараты (диклофенак, ибупрофен, пироксикам), толбутамин [127]. Как уже упоминалось, анализ полиморфизма гена *CYP2C9* стал первым официально одобренным генетическим тестом (см. выше). Количество индивидов, имеющих сниженную активность данного фермента, в отечественной популяции составляет до 20% [680]. При этом во избежание нежелательных побочных эффектов лечебную дозу вышеперечисленных препаратов у носителей аллелей *2 и *3 гена *CYP2C9* необходимо уменьшать в 2–4 раза.

Ген *CYP2C19* локализован в локусе 10q24.1-q24.3, экспрессируется в печени. Его белковый продукт является основным ферментом метаболизма ингибиторов протонного насоса (омепразол) и противосудорожных препаратов (прогуанил, вальпроевая кислота, диазепам, барбитураты). Частота его «медленного» аллеля (*2) в европейской популяции колеблется от 5 до 20% [680].

Подсемейство *CYP2D*. Цитохром *CYP2D6* метаболизирует около 20% всех известных лекарственных средств. Ген *CYP2D6* локализован на 22 хромосоме в локусе 22q13.1. Основным местом его экспрессии является печень. В настоящее время в гене *CYP2D6* идентифицировано более 36 аллелей, некоторые из них характеризуются отсутствием белкового продукта, а другие приводят к появлению фермента с измененными свойствами. Субстратами фермента *CYP2D6* являются такие широко используемые в клинической практике лекарственные средства, как бета-адреноблокаторы, антидепрессанты, антипсихотропные вещества, антиаритмические, нейролептики, противогипертензивные препараты, ингибиторы монооксидредуктазы, производные морфина, нейротрансмиттеры (допамины), анальгетики, опиаты. Принимая во внимание, что около 6–10% европеоидов относятся к медленным метаболитам по этому ферменту, очевидна необходимость в генетическом тестировании *CYP2D6* с целью коррекции доз упомянутых препаратов. Кроме того, «функционально ослабленные» аллели этого гена ассоциированы с наследственной предрасположенностью к таким тяжелым болезням, как рак легкого, рак кишечника и др.

Подсемейство *CYP2E*. Цитохром *CYP2E1* относится к этанолиндуцибельным ферментам. Его субстратами являются карбонтетрахлорид, диметилнитрозамин. Есть данные о том, что *CYP2E1*, наряду с *CYP1A2*, участвует в превращении парацетамола в N-ацетилбензохи-

нонимин, обладающий мощным гепатотоксическим действием [127]. Кроме того, он является наиболее важным изоферментом группы цитохромов, окисляющих холестерин липопротеинов низкой плотности, что, в свою очередь, ведет к образованию атеросклеротических бляшек. Ген *CYP2E1* локализован в локусе 10q24.3-qter, экспрессируется в печени взрослых людей. Таq1-полиморфизм в гене *CYP2E1* приводит к снижению активности данного фермента. Гомозиготы *М/М* по ослабленному аллелю гена *CYP2E1* обнаруживают повышенную чувствительность к вышеуказанным препаратам вследствие их замедленной детоксикации.

Семейство цитохрома Р-450 CYP3

Подсемейство CYP3A наиболее многочисленное. На его долю приходится около 30 % всех изоферментов цитохрома Р-450 в печени и 70 % всех изоферментов стенки желудочно-кишечного тракта [127]. Наиболее значимыми являются ферменты CYP3A4 и CYP3A5, гены которых локализованы в локусе 7q22.1. В печени экспрессируется преимущественно ген *CYP3A4*, а в желудочно-кишечном тракте — *CYP3A5*.

Фермент CYP3A4 метаболизирует свыше 60 % всех лекарств и играет большую роль в метаболизме тестостерона и эстрогенов. Аллельные варианты гена *CYP3A4* весьма многочисленны, но данные об их влиянии на фармакокинетику соответствующих лекарственных средств противоречивы.

Фермент CYP3A5 метаболизирует часть лекарств, с которыми взаимодействует CYP3A4. Показано, что наличие аллеля *3 гена *CYP3A5* приводит к снижению клиренса таких лекарств, как альпразолам, мидазолам, саквинавир [127].

Параоксоназа — фермент, отвечающий за синтез параоксоназы — белка плазмы крови. Помимо этого фермент инактивирует фосфорорганические соединения, органофосфаты, карбаматы, эфиры уксусной ксилоты. Часть из этих веществ является боевыми отравляющими веществами — зарин, зоман, табун. Из известных трех изоформ наибольшее значение имеет фермент PON1. Ген его локализован в локусе 7q21.3. Наиболее значимым и изученным полиморфизмом является замена глутамина на аргинин в 192 положении (L/M-полиморфизм). Показано, что аллель *М* ассоциирован со сниженным метаболизмом фосфорорганических соединений.

Аллель *M* и *M/M*-генотип увеличивают риск развития болезни Паркинсона, особенно в сочетании с *B*-аллелем гена *GSTP1*, и ассоциированы с образованием атеросклеротических бляшек.

Алкоголь- и альдегиддегидрогеназы

Алкогольдегидрогеназа является ключевым ферментом в катаболизме этанола и других спиртов, окисляя спирты до альдегидов. У взрослого человека ген *ADH1B* экспрессируется в печени. Существует определенная динамика уровня его экспрессии в зависимости от возраста. Ген *ADH1B* (*ADH2*) локализован в локусе 4q22. Наиболее изученный полиморфизм — G141A. Показано, что аллель *A* связан с повышенной активностью фермента, что приводит к избыточному накоплению промежуточных продуктов метаболизма — альдегидов, обладающих выраженным токсическим эффектом. Индивидуумы с аллелем *A* гена *ADH1B* имеют повышенную чувствительность к этанолу и менее подвержены алкоголизму.

В клетках печени присутствуют также две альдегиддегидрогеназы: *ALDH1* (цитозольная) и *ALDH2* (митохондриальная). Ген *ALDH2* локализован в локусе 12q24.2, его продукт играет ключевую роль в превращении токсичных альдегидов в соответствующие карбоновые кислоты, легко удаляемые из организма. *ALDH2* играет важную роль в катаболизме алкоголя. Известно, что у представителей желтой расы алкогольная интоксикация обусловлена отсутствием *ALDH2* почти у 50% населения. Полиморфизм в гене *ALDH2* приводит к замене Glu в 487 положении белка (*ALDH2*1*-аллель) на Lys (*ALDH2*2*-аллель). *ALDH2*2*-аллель кодирует фермент со сниженной активностью. У гетерозигот активность фермента снижена в 10 раз. Фермент *ALDH2* вовлечен в патогенез различных раков, связанных с чрезмерным потреблением алкоголя, — гепатоцеллюлярная карцинома, рак пищевода, глотки и ротовой полости.

Интенсивный прием алкоголя у лиц с неблагоприятными аллельными вариантами генов *ADH1B* и *ALDH2* может привести к быстрому развитию печеночных осложнений: алкогольной болезни и циррозу печени.

7.2.4. Гены и ферменты II фазы биотрансформации

Глюкоронилтрансферазы. Одним из путей нейтрализации токсических продуктов, возникающих вследствие действия ферментов I фазы биотрансформации, является глюкоронирование — присоеди-

нение к субстрату УДФ-глюкороновой кислоты [127]. Этот процесс осуществляют ферменты УДФ-глюкоронилтрансферазы, из которых наиболее значимыми являются два изофермента — *UGT1* и *UGT2*. Эти ферменты принимают участие в метаболизме билирубина, различных гормонов (тироксин, трийодтиронин), морфина, хлорамфеникола, парацетамола и других соединений. Администрацией по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (Food & Drug Administration) (FDA) одобрено исследование полиморфизма гена *UGT1A1* (аллелей *1B, *26, *60) для коррекции терапии иринотекана с целью профилактики развития гипербилирубинемии [127]. Кроме того, показано, что у гомозигот *C/C* по гену *UGT2B7* (полиморфизм C802T) снижена скорость метаболизма морфина, что сопровождается накоплением промежуточных метаболитов у пациентов с выраженным болевым синдромом [127].

Ацетилтрансферазы. За ацетилирование отвечают два фермента — *NAT1* и *NAT2*. Изучение полиморфизма гена *NAT1* только начинается, тогда как важная роль гена *NAT2* в фармакогенетике твердо доказана. Ген *NAT2* локализован в локусе 8p23.1-p21.3, экспрессируется преимущественно в печени, отвечает за ацетилирование большей части ариламинов. В зависимости от активности фермента *NAT2* всех людей разделяют на «быстрых», «промежуточных» и «медленных» ацетиляторов. В настоящее время известно 36 аллелей этого гена, которые различаются сочетанием 12 миссенс-мутаций, 4 «молчащих» мутаций и делеции одного нуклеотида, приводящей к сдвигу рамки считывания [18].

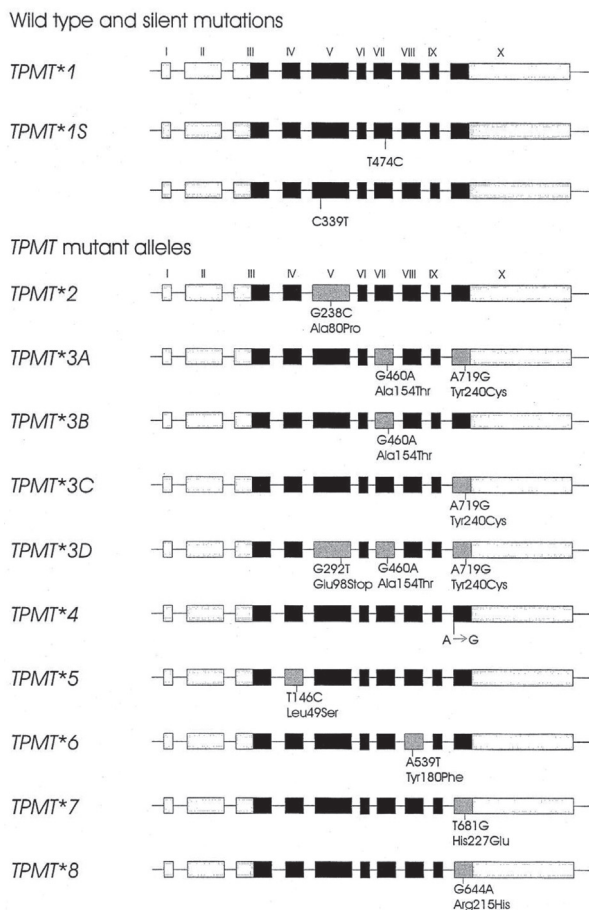
Частоты аллелей *NAT2*-гена в разных популяциях значительно варьируют. К наиболее распространенным у европеоидов «медленным» аллелям относятся *NAT2*5* (*T341C*) и *NAT2*6* (*G590A*). Аллель *NAT2*7* (*G857A*) характерен для монголоидов, а аллель *NAT2*14* (*G191A*) встречается только у негроидов. Распространенность «медленных» ацетиляторов варьирует от 10–15% у монголоидов до 50% у представителей европеоидной расы [30, 126].

В настоящее время установлена ассоциация полиморфизма гена *NAT2* с различными МФЗ и с различной чувствительностью к лекарственным препаратам [621]. У «медленных» ацетиляторов частота рака мочевого пузыря в 2–3 раза выше, чем у «быстрых», однако среди «быстрых» ацетиляторов в 1,8 раза чаще встречается колоректальный рак [30]. У активно курящих в постменопаузальный период женщин,

относящихся к «быстрым» ацетиляторам, частота рака молочной железы нередко оказывается ниже популяционной, что, возможно, обусловлено антиэстрогенным действием табачного дыма [354]. «Медленные» ацетиляторы обнаруживают повышенную чувствительность к некоторым лекарственным препаратам. У них нередко отмечаются побочные иммуотоксические эффекты ариламинов и гидразинов. К таким соединениям относятся, в частности, противотуберкулезные препараты (изониазид, р-анизид), антиаритмические препараты (прокаинамид), амонафид, 2-аминофлуорен. У них часто наблюдается идиосинкразия к различным лекарственным препаратам.

Тиопуринметилтрансфераза (ТПМТ) — фермент, катализирующий реакцию S-метилирования, — основной путь метаболизма таких сильных цитостатиков, как 6-меркаптопурин, азатиоприн и 6-тиогуанин. Эти вещества используются в терапии таких онкологических заболеваний, как лейкозы, лимфомы, саркомы. Их также применяют для подавления иммунной реакции при трансплантации органов. Ген *TPMT* локализован в локусе 6p22.3 и экспрессируется в печени, почках, эритроцитах, лейкоцитах, кишечнике и в ряде других тканей. Максимальное содержание белка наблюдается в печени и почках. Идентификация точечных мутаций в гене *TPMT* у пациентов с низкой активностью фермента ТПМТ позволила предположить, что именно они ассоциированы с потерей активности белка и, соответственно, приводят к нарушению метаболизма 6-МП в организме этих пациентов. В настоящее время описано восемь различных аллелей, кодирующих фермент с низким уровнем активности (рис. 7.2.3). Для российской популяции наиболее характерны аллели *3A, *3C, *2 [702]. Наличие этих аллелей требует снижения стандартной дозы 6-меркаптопурина в 2–4 раза.

Сульфотрансферазы участвуют в инактивации таких распространенных токсических соединений, как фенолы, а также в метаболизме гормонов щитовидной железы, катехоламинов и некоторых стероидных гормонов [127]. Наибольший интерес для фармакогенетики представляют сульфотрансферазы SULT1A1 и SULT1A3. Первая метаболизирует парацетамол, морфин, продукты распада лидокаина, 17-β-эстрадиол. Субстратами SULT1A3 являются допамин, серотонин и некоторые другие метаболиты. Четких данных об ассоциации полиморфизма генов этих ферментов с дозами соответствующих лекарственных средств в настоящее время нет.

Рис. 7.2.3. Аллели гена *TPMT*

Примечание: прямоугольниками обозначены экзоны в гене *TPMT* человека. Белые прямоугольники соответствуют нетранслируемым регионам, черными прямоугольниками обозначены экзоны, которые содержат открытую рамку считывания. Серые прямоугольники — экзоны, которые содержат мутации, приводящие к аминокислотным заменам.

Эпоксидгидролазы осуществляют водную конъюгацию. Выделяют два типа эпоксидгидролаз — микросомальную и цитоплазматическую. Оба фермента локализованы преимущественно в печени, но различаются своей субстратспецифичностью [18]. Большая часть реакций катализируется микросомальной эпоксидгидролазой — *EPHX1*.

Ген *EPHX1* локализован на хромосоме 1, в локусе 1q42.1. Наличие индивидуальных различий в активности этого фермента определяется

существованием генетического полиморфизма гена *EPHX1*, который обусловлен однонуклеотидными заменами в 3 экзоне (мутация T337C (Tyr113His), генотип *S/S*) и в 4 экзоне (мутация A415G (His139Arg), генотип *F/F*). Данные полиморфные варианты четко коррелируют с уровнем ферментативной активности гена *EPHX1*. Полиморфизм Tyr113His характеризуется снижением активности фермента у гомозигот (генотип *S/S*) на 50 % и на 25 % у гетерозигот (генотип *S/N*). Низкая активность фермента также наблюдается у гомозигот или гетерозигот *His113* в комбинации с гомозиготами *His139*. Промежуточную активность фермента имеют гомозиготы *Tyr113* и *His139* или гетерозиготы *Tyr113* и *His139*. У гомозигот *Arg139* и гетерозигот *Arg139* в комбинации с гомозиготами *Tyr113* наблюдается высокая активность фермента. Показано, что «медленный» аллель *EPHX1*-гена встречается примерно у 6 % европейцев и приводит к нарушению процесса окисления ксенобиотиков. Выявлена ассоциация «медленного» аллеля *EPHX1*-гена с заболеваниями органов дыхания [64]. В сочетании с курением у таких индивидов чаще, чем в среднем в популяции, развиваются обычные респираторные заболевания, а также эмфиземы и обструктивная пневмония [30]. Отмечена ассоциация некоторых полиморфных вариантов гена *EPHX1* с различными нарушениями в репродуктивной системе (преэклампсии, спонтанные аборты), а также с онкологическими заболеваниями (рак легких, яичников) [683].

Глютатионтрансферазы обеспечивают конъюгацию SH2 группы глутамата с органическими электрофильными ксенобиотиками, в том числе и многочисленными повреждающими веществами, широко представленными в атмосфере индустриально загрязненных городов. Продукты, образующиеся вследствие реакции с глютатион-S-трансферазами, имеют повышенную растворимость в воде и быстрее выводятся из организма. **Глютатионопосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению жиров, алкилированию белков, свободным радикалам и в предотвращении поломок ДНК.** Глютатион-S-трансферазы также играют важную роль в транспорте билирубинов, гормонов, в биосинтезе простагландинов.

Ген *GSTM1* — один из генов суперсемейства глютатионтрансфераз класса μ , локализован в локусе 1p13.3, где он входит в состав кластера генов семейства *GSTM5–GSTM4–GSTM2–GSTM1–GSTM5–3*. Все гены данного кластера гомологичны друг другу. *GSTM1* кодирует белок,

участвующий в глутатионопосредованной детоксикации и играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к продуктам перекисного окисления жиров, алкилирования белков, к свободным радикалам, предотвращая, таким образом, поломки ДНК. Аналогичную функцию выполняет глутатионтрансфераза *GSTT1*.

Полиморфизм гена *GSTM1* обусловлен наличием/отсутствием протяженной делеции (около 10 kb), следствием которой является полное отсутствие белкового продукта («нулевой» аллель). Частота гомозигот по «нулевому» аллелю в российской популяции составляет около 40 %. [698]. Ген *GSTM1* выступает в качестве модификатора и фактора риска при самых разных заболеваниях, связанных с неблагоприятным действием факторов внешней среды на организм. Таковыми являются: 1) различные злокачественные опухоли (особенно рак легкого, мочевого пузыря, молочной железы и яичников, кожи), 2) доброкачественные новообразования (аденома прямой кишки, эндометриоз), 3) хронические МФЗ (хронический бронхит, алкогольный цирроз печени, астма) [30, 44]. Сравнительно недавно была установлена корреляция между частотой хромосомных aberrаций, мутагенной активностью и наличием *GSTM1 0/0* генотипа [680]. У таких индивидов, если они курят, мутагенный и канцерогенный риск выражены особенно сильно (в 3 раза выше по сравнению с курильщиками без дефицита этих ферментов). При сочетании дефицита *GSTM1* и медленной формой N-ацетилтрансферазы (*NAT2*) риск рака молочной железы у курящих женщин увеличивается почти в 20 раз [30].

Ген *GSTT1* относится к генам суперсемейства глутатионтрансфераз класса θ , локализован в локусе 22q11.2 вместе с геном *GSTT2*, идентичным на 55 % гену *GSTT1*. Так же, как ген *GSTM1*, ген *GSTT1* участвует в глутатионопосредованной детоксикации продуктов перекисного окисления жиров, свободных радикалов, алкилирования белков. Полиморфизм *GSTT1* (как и гена *GSTM1*) обусловлен наличием/отсутствием протяженной делеции, которая приводит к полному отсутствию белкового продукта («нулевой» аллель). Частота гомозигот по «нулевому» аллелю в российской популяции составляет 15–20 %. У таких индивидов зарегистрирована повышенная предрасположенность к эпителиальному раку яичников и базально-клеточному раку кожи, эндометриозу, бронхиальной астме (см. раздел 6.1). Делеционный аллель гена *GSTT1* усиливает неблагоприятный эффект *GSTM1 0/0* аллеля [680].

Ген *GSTP1* — один из генов суперсемейства глутатионтрансфераз класса π , локализован в локусе 11q13, кодирует белок, участвующий в глутатионопосредованном связывании гидрофобных и электрофильных соединений. Белковый продукт гена *GSTP1* относится к наиболее важным изоформам глутатионтрансфераз репродуктивного тракта и плаценты. Играет важную роль в детоксикации пестицидов и в процессах канцерогенеза. Ген *GSTP1* существует в трех аллельных вариантах: *A*, *B*, *C*. Аллель *A* (*GSTP1***A*) — нормальный вариант. «Мутантные» аллели *B* и *C* кодируют функционально менее активные формы фермента (активность снижена в 3–4 раза). *GSTP1***B*-аллель возникает в результате замены АТС-сайта (ile) в 105 кодоне на ГТС-сайт (val). Если помимо замены в кодоне 105 в кодоне 114 имеется замена GCG-сайта (ala) на GTG-сайт (val), возникает аллель *GSTP1***C*. Частота мутантных аллелей *B* и *C* в российской популяции составляет около 14%. Мутантные аллели гена *GSTP1*, особенно в сочетании с «нулевыми» аллелями генов *GSTT1* и *GSTM1*, приводят к увеличению риска развития некоторых онкологических заболеваний. Уровень *GSTP1* резко снижен при раке легкого, кишечника, яичников, семенников, мочевого пузыря, почек, гортани и особенно кожи. Функционально неполноценные аллели вносят вклад в привычное невынашивание и спонтанные аборты (см. раздел 6.6.2).

7.2.5. Транспортёры лекарственных средств

Важную роль в фармакокинетике играют ферменты, обеспечивающие всасывание, распределение и выведение из организма лекарственных средств, так называемые «транспортёры лекарств» [204]. Так, всасывание лекарств из кишечника обеспечивает транспортер 1 олигопептидов (PEPT1) и полипептид В, транспортирующий органические анионы (ОАТР-В). Захват лекарств, циркулирующих в крови, происходит: 1) при участии полипептидов А, В, С (ОАТР-А, ОАТР-В, ОАТР-С), 2) транспортерами органических анионов 1, 2, 3 (ОАТ1, ОАТ2, ОАТ3), а за выброс лекарственных средств в просвет кишечника отвечает гликопротеин Р (ген *MDR1*) [127].

Наибольший интерес для фармакогенетики представляет полиморфизм гена *MDR1*, кодирующий гликопротеин Р. Этот фермент локализован в цитоплазматических мембранах и контролирует АТФ-зависимый выброс различных ксенобиотиков из клетки. Ген *MDR1* локализован в локусе 7q21.1, экспрессируется во многих органах, включая печень,

почки, кишечник. Его экспрессия в 2,5 раза выше у мужчин, чем у женщин. Субстратами гликопротеина Р являются сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, макролиды, цитостатики, противовирусные препараты и др. Наиболее значимым полиморфным маркером гена *MDR1* является замена цитозина на тимин в 26 экзоне (C3435T). У гомозигот по *T*-аллелю функции белка *MDR1* нарушены, что может быть причиной тяжелой интоксикации в случае применения целого спектра лекарств.

7.2.6. Фармакодинамика и полиморфизм генов

Как представлено на рисунке 7.2.1 индивидуальная чувствительность к лекарственным препаратам в значительной мере определяется функциональным состоянием белков, обеспечивающих их фармакодинамику. В первую очередь это относится к рецепторным белкам. Так, замена *48C>G* в гене β -адренорецептора-2 (*ADRB2*) снижает бронхолитический эффект агонистов β -адренорецепторов (сальбутамол) [127]. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) у больных с гипертонией значительно менее эффективны у лиц с *D/D*-генотипом по гену *ACE*, чем с *I/I*-генотипом (*I/D*-полиморфизм) (см. раздел 6.5). В то же время замена *-58T>C* в гене рецептора брадикина (*BKR2*) значительно чаще осложняется сухим кашлем на фоне лечения гипертонии ингибиторами АПФ, чем при отсутствии этой мутации [296].

7.2.7. Биочиповые нанотехнологии в фармакогенетике

Обусловленная генетическим полиморфизмом различная индивидуальная чувствительность к лекарственным препаратам настоятельно требует разработки быстрых, адаптированных к клинике методов тестирования аллельных вариантов соответствующих генов. Особый интерес для решения этой проблемы представляют автоматические и полуавтоматические методы, основанные на использовании биочипов (см. главу 4). Такая технология активно разрабатывается во многих, в том числе в отечественных, лабораториях и институтах. Технология биочипов в России была инициирована академиком А. Д. Мирзабековым в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН. В этом институте с участием других ученых, в том числе и нашей лаборатории, были созданы и внедрены в клиническую практику несколько фармакогенетических чипов.

Первым из них был биочип, предназначенный для изучения предрасположенности, прогноза и эффективности лечения больных лейкозами. Биочип предполагает одномоментное тестирование полиморфизма 10 генов (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*). Клинические испытания биочипа показали, что у пациентов с острым лейкозом, имеющих генотип *NAT2* 341T/T, 481C/C, 590G/G, либо сочетание быстрого генотипа *NAT2* с «нулевым» *GSTT1*-генотипом или «нулевым» *GSTM1*-генотипом, а также с двойным «нулевым» *GSTT1/GSTM1*-генотипом рецидивы заболевания встречаются достоверно чаще [680]. Показана ассоциация вариантного генотипа *CYP1A1* *1/*2A и *GSTT1*+/+ (+/-) генотипов с развитием рецидива острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). При анализе распределения частот аллелей гена *NAT2* впервые обнаружено, что у пациентов с рецидивом ОЛЛ преобладает генотип *NAT2* 341C/-, 481T/-, 590G/G, 857G/G, тогда как у пациентов с рецидивом острого миелолейкоза (ОМЛ) — генотип 341T/T, 481C/C, 590A/- (по сравнению с пациентами с первично диагностированным ОЛЛ и ОМЛ соответственно). Анализ распределения индивидуальных аллельных вариантов этих генов позволяет оптимизировать схему лекарственной терапии таких больных.

Фармбиочип, позволяющий тестировать 14 мутаций семи генов системы детоксикации и гена *MTHFR*, нашел применение для выбора тактики лечения такого частого МФЗ, как эндометриоз (см. раздел 6.6.1).

TPMT-биочип разработан для отбора пациентов с повышенным риском токсичности в случае применения цитостатических препаратов на основе 6-меркаптопурина [702]. Наличие аллелей *3A и *3C, а также аллеля *2 гена *TPMT* указывает на необходимость снижения стандартной дозы 6-меркаптопурина в 2–4 раза.

Шведскими исследователями создан микрочип, включающий 34 гена и 98 вариантов полиморфизма (SNP) ренин-ангиотензиновой, адренергической, эндотелиальной систем, а также метаболизма липидов и некоторые другие. С помощью этого чипа удалось выяснить эффективность противогипертензивной терапии. В частности, было установлено, что снижение показателей систолического артериального давления при лечении гипотензивными препаратами (атенолол, ирбесартан) зависит от полиморфизма генов *APOA* (A1449G), *CYP11B2* (T267C) (атенолол), *ADRA2A* (G278T), *ADRB2* (G1342C), *AGT* (C1015T) (ирбесартан) и *EDNRB* (G40A), *NOS3* (G498A) для обоих препаратов.

Снижение диастолического артериального давления ассоциировано с полиморфизмом генов *APOA* (*A1449G*), *ACE* (*A12257G*), *AGT* (*C1198T*) (атенолол), *ADRB2* (*G1309A*), *NOS3* (*A2996G*), *ADRA2A* (*G1817A*), *EDNRB* (*G40A*) (ирбесартан) и *LIPC* (*A110G*) для обоих препаратов [231].

Заключение

Как и другие разделы предиктивной медицины, фармакогенетика и фармакогеномика все еще находятся в начале пути. Между тем, в отличие от исследований генных ассоциаций при МФЗ, где сама постановка точного клинического диагноза и отбор однородных репрезентативных групп пациентов нередко сопряжены со значительными трудностями, генетические исследования особенностей индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам представляются более конкретными и обнадеживающими. Действительно, точные данные о химической структуре тестируемых лекарств, подробно изученные биомеханизмы их действия, дополненные современными данными о структуре соответствующих генов и их полиморфизме, являются важной предпосылкой быстрого прогресса этого перспективного направления. Более того, выявление ассоциаций полиморфных вариантов генов (аллелей) с различной индивидуальной чувствительностью к лекарственным препаратам позволяет уточнить патогенез заболевания и предложить оптимальную стратегию лечения с учетом биохимической индивидуальности пациента. Неслучайно именно в фармакогенетике генетические исследования уже вышли на уровень лабораторных тестов, утвержденных при некоторых видах лекарственной терапии. Нет сомнения, что дальнейшая разработка автоматических и полуавтоматических методов генетического тестирования с помощью биочипов и других современных методов генетического анализа, адаптированных к возможностям клинических лабораторий, будет способствовать быстрому и широкому внедрению фармакогенетики и фармакогеномики в клиническую медицину.

Среди многочисленных генетических анализов, предлагаемых для тестирования наследственной предрасположенности, именно фармакогенетический биочип (см. раздел 7.2.7) первым получил регистрационный номер МЗ РФ и уже сегодня каждый желающий может пройти генетический тест с целью выяснения своих индивидуальных фармакогенетических особенностей.

7.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СТАРЕНИЯ И АКТИВНОГО ДОЛГОЛЕТИЯ

Введение

Наряду с рождением, половым созреванием, периодом зрелости и расцвета неперенным составляющим жизни является период увядания — старение. Известно, что продолжительность жизни за последние 200 лет удвоилась, а по некоторым прогнозам средняя продолжительность жизни в 2065 году составит около 100 лет [477].

Что же такое старение? Каковы его причины? Каков вклад генетических факторов в этот процесс? Что собой представляют гены старения и гены «долгожительства»? Что такое медицина антистарения? Можно ли замедлить процесс старения и, соответственно, продлить период активного долголетия человека? Ответы на эти вопросы в свете современной генетики составляют задачу данной главы.

Следует отметить, что старение организма — процесс глобальный, то есть он затрагивает все органы, ткани и системы жизнеобеспечения. Естественно, что, как и все предшествующие стадии онтогенеза, данный процесс контролируется как самим геномом, так и теми условиями внешней среды, в которых реализуется уникальная наследственная программа каждого человека. Считается, что на долю генетических факторов приходится только до 30 % «детерминант» старения. Получены данные, свидетельствующие о существенной наследуемости долгожительства. Так, потомки столетних имеют в 4 раза большую вероятность прожить 85 лет и более, чем потомки тех, кто умер до 73 лет [654]. Основная и, по-видимому, решающая роль в старении (до 70 %) принадлежит факторам внешней среды. Известно, что заведомо неблагоприятно сказываются на продолжительности жизни и сокращают ее в среднем на 10 лет избыточный вес (75 %), ожирение (33 %), курение и отсутствие физической активности [433, 541]. Расшифровка генома человека, знаменовавшая собой завершение Международной программы «Геном человека», придала новый импульс в изучении процессов генетики старения [361]. Несмотря на очевидные успехи этого перспективного направления, многие концептуальные и фактические стороны генетики старения остаются малоизученными, а некоторые из уже устоявшихся представлений требуют серьезного пересмотра.

Определение понятий. Теории старения

Сравнительно долго в генетике господствовало представление о том, что **старение — это побочный продукт реализации генетической программы индивидуального развития**. Такое определение принадлежит знаменитому Августу Вейсману. Действительно, все высшие организмы проходят одни и те же стадии онтогенеза, завершающимися этапами которого являются старение и смерть. Более того, у многих эукариот разных классов и видов (растения, дрожжи, черви, насекомые, рыбы) смерть, действительно, выступает в качестве генетически четко запрограммированного этапа жизненного цикла. У многих животных даже идентифицированы гены, определяющие продолжительность жизни. Например, регулятор хроматина ген *sir2* у дрожжей, рецептор инсулинового фактора роста — *daf2* — у аскариды, мух, мышей, ген рецептора тирозин-киназы — у дрозофилы, онкосупрессор *p53* — у мышей и даже ген ДНК-геликазы, приводящий к синдрому преждевременного старения и смерти у человека [15, 487]. Другие «генетические» теории старения касаются **прогрессивного нарастания и накопления с возрастом мутаций, приводящих к ошибкам экспрессии или прекращению работы отдельных генов** (теория Питера Медавара). Сюда же относится и так называемая **теория антагонистичной плейотропии** Джорджа Вильямса, объясняющая старение многообразием функций полиморфных вариантов различных генов, продукты которых обеспечивают важные на ранних этапах жизнедеятельности метаболические реакции (пролиферация клеток, процессы дифференцировки), но выступающих в качестве факторов риска многих мультифакториальных болезней в зрелом возрасте.

Вместе с тем, учитывая сложность и многообразие молекулярных, биохимических, физиологических и клеточных проявлений, вполне оправданным представляется определение старения как процесса, связанного с **прогрессивным замедлением всех физиологических функций организма** [15]. Такое определение является более универсальным и вполне согласуется с последними достижениями в геронтологии человека, достигнутыми с помощью современной функциональной геномики и показавшими, что **старение организма обусловлено истощением его внутренних ресурсов, это медленная дегенерация его транскриптома — транскрибируемой части генома** [764].

Такое определение старения на современном уровне геронтологических знаний представляется вполне адекватным и в значительной

мере включает в себя положения предшествующих теорий и гипотез, пытавшихся объяснить причины старения. К ним относятся такие хорошо известные теория старения, как **теория оксидативного стресса и свободных радикалов** (Н. М. Эммануэль, 1954), **митохондриальная теория** (К. Линнаме, 1989), **клеточная теория старения** (Л. Хайфлик, М. Мурхед, 1961), **гипотезы нарушения спектра и функций белков, процессов гликозилирования и окисления липидов, теория нейрогуморальной дезрегуляции** (В. М. Дильман, 1957), а также **теломеразная теория старения** (А. М. Оловников, 1971). Каждая из этих теорий основана на конкретных фактах и многочисленных наблюдениях. Все эти теории детально рассмотрены в ряде фундаментальных отечественных монографий, посвященных анализу процессов старения [15, 78]. Вместе с тем, возводя в абсолют поломки тех или иных систем жизнеобеспечения организма, эти теории не в состоянии объяснить все многообразие процессов, происходящих в стареющем организме.

Таким образом, за последние годы, главным образом в результате решающего прорыва науки в области генетики, понятие «старение» претерпело определенную эволюцию, в результате которой основное внимание в исследованиях по геронтологии сегодня уделяется изучению особенностей функции всего генома и отдельных генов на разных стадиях онтогенеза.

7.3.1. Гены старения

Важнейшим итогом выполнения Международного проекта «Геном человека» явилась идентификация практически всех генов человека, многие из которых, как показали дальнейшие исследования, прямо или косвенно вовлечены в процессы старения. Старение человека, так же как и его геном, очень индивидуально.

В сильно упрощенном варианте все гены, определяющие старение и продолжительность жизни человека, достаточно условно подразделяются на две большие группы: **гены биологических часов** (1) и **гены «слабого звена»** (они же **гены предрасположенности**) (2) [41, 42].

7.3.1.1. Гены биологических часов

В настоящее время известна весьма многочисленная группа генов, участие которых в процессах старения доказано в экспериментах, а их гомологи (так называемые ортологичные гены) уже идентифицированы у человека и исследуются в геронтологии. Подробный обзор генов

Таблица 7.3.1

Экспериментально установленные и подтвержденные гены «биологических часов» [42]

№	Символ гена	Название гена/функции
1	<i>FOXO 1–4</i>	Рецептор инсулина и инсулинового ростового фактора IGF-1
2	<i>KLOTHO</i>	Обмен инсулина, IGF1, витамина D
3	<i>PROPI</i>	Модуляция уровня гормонов гипофиза
4	<i>HGF</i>	Гормон роста человека
5	<i>CLOCK</i>	Синтез кофермента Q-убиквитина
6	<i>CAT</i>	Каталаза (обезвреживание перекисных соединений)
7	<i>P66She</i>	Нейтрализация свободных радикалов
8	<i>MTP</i>	Микросомальный белок-переносчик
9	<i>CETP</i>	Белок-транспортёр холестерина
10	<i>TOR</i>	Рост и питание клеток
11	<i>PPARA</i>	Регулятор обмена жирных кислот и типа гликолиза
12	<i>SIRT1</i>	Предполагаемый главный регулятор процесса старения

биологических часов приведен в монографии А. А. Москалева (2008). Некоторые такие гены представлены в таблице 7.3.1.

Особенно подробно изучены гены так называемого инсулинового каскада обеспечивающего обмен глюкозы. Он представлен генами гормона роста (*HGF*), тирозинкиназы, инсулиновым ростовым фактором и его регулятором (IGF-1 и *Klotho*), рецептором IGF и его регулятором (rIGF, *FOXO1–4*). На многих биологических объектах, а для отдельных генов и на человеке, показано, что аллельные варианты этих генов, тормозящие или частично блокирующие обмен глюкозы, весьма благотворно сказываются на продолжительности жизни [41, 637].

Так, мутации и полиморфизм в гене *IGF* (варьирование числа повторов в промоторной области гена, G/A-полиморфизм), которые снижают активность экспрессии этого гена, ассоциированы с долголетием [527]. Аллельные варианты и мутации генов *daf-2* и *FoxO* (ортологи генов *IGF-1* и *FOXO1–4* человека) способны почти вдвое удлинять жизнь дрозофилы и мышей [341]. На 30% увеличивается продолжительность жизни мышей с *KL-VS*, аллелем гена *Klotho*, продукт которого участвует в регуляции выработки инсулина через ген *IGF-1* и в обмене костной ткани через ген рецептора витамина D — *VDR* [275, 542].

Значительное удлинение продолжительности жизни (до 150 % от средней величины) отмечается у мышей и крыс, несущих мутации карликовости в гене гормона роста *GF*, который открывает инсулиновый каскад, а также в генах, модулирующих уровень гормонов и гормональную активность гипофиза (*PROPI*). Существенно отметить, что практически во всех случаях продолжительность жизни находится в обратной зависимости от потребления и расхода калорий. Метаболические эффекты в организме, связанные с мутациями и аллельными вариантами генов инсулинового каскада, очень сходны с таковыми при голодании или ограничении калорийности питания — наиболее известными и хорошо доказанными в экспериментах и в клинике способами продления жизни.

Известно также, что продолжительность жизни обратно пропорциональна интенсивности дыхания и процессов обмена, вследствие которых возникают опасные для организма перекиси и свободные радикалы (*ROS — Reactive Oxygen Substances*). Неслучайно среди генов, влияющих на продолжительность жизни (см. табл. 7.3.1), находятся ген каталазы (*CAT*), обезвреживающей перекисные соединения, ген *P66She*, продукт которого уничтожает свободные радикалы, и семейство генов *Clock*, регулирующих синтез и активность кофермента Q-убиквитина, нейтрализующего все метаболические токсины клетки. Положительный эффект на продолжительность жизни оказывает и ген *CETP* (cholesterol ester transfer protein), мутация которого в 405 кодоне ведет к увеличению размеров липопротеиновых (холестериновых) частиц в крови, что препятствует их проникновению в стенки сосудов и формированию атеросклеротических бляшек [477].

Заслуживает внимания и регуляторный ген *PPARA*, контролирующей экспрессию множества генов, вовлеченных в обмен жирных кислот и глюкозы. Полиморфизм этого гена (замена G на C в кодоне 372) приводит к переключению аэробного гликолиза (генотип *G/G*) на анаэробный (генотипы *G/C* или *C/C*) [637].

Особое внимание исследователей проблемы генетики старения привлекают сегодня гены семейства Сиртуинов (**SIRTUIN — silence information regulators — регуляторы замалчивания информации**). Один из генов этого семейства *SIRT2*, открытый в 2001 году Ленни Гайренте у дрожжей, оказался непосредственно вовлеченным в регуляцию процессов старения у разных организмов (дрожжи, аскарида, дрозофила и мыши). Как показали дальнейшие исследования, гены этого



Рис. 7.3.1. Основные метаболические пути белков семейства Сиртуинов

семейства активируются под влиянием дефицита калорий, а также в результате действия других стрессорных факторов. Его непосредственным индуктором оказался никотинамид динуклеотид (NAD) — продукт окисления NAD-H (см. раздел 7.1). Белки генов *SIRT* стимулируют выработку различных сигнальных молекул, например инсулина, повышают стабильность ДНК путем скручивания двойной спирали, активируют репаративные и защитные механизмы клетки, повышают скорость энергообмена, угнетают функции апоптозных генов, координируют реакцию на стресс клетки и организма в целом (рис. 7.3.1).

Как глобальный регулятор генной активности ген *SIRT1* является лучшим кандидатом для объяснения благотворного воздействия ограничения калорийности питания на здоровье и продолжительность жизни [192]. Координирующие эффекты генов этого семейства реализуются через белковые продукты других регуляторных генов: *P53*, *FOXO*, *Ku70*, *MYOD*, *NCoR*, через гистоны *H3*, *H4* и *H1* и гены, регулирующие ацетилирование гистонов *P300*. Результатом работы генов *SIRT* является увеличение продолжительности жизни клеток и организма в целом. Эффект долгожительства таких генов уже показан на дрожжах, дрозофиле, червях и мышах, у которых избыток продукта этих генов увеличивал продолжительность жизни на 30–49%.

Складывается впечатление, что именно повышением активности генов семейства *Sirtuin* можно объяснить благотворное влияние голодания на продолжительность жизни человека. Индукция активности этих генов может быть достигнута и при помощи экзогенных факторов, например препарата резвератрола, который содержится в красных винах. Известны уже около 18 других веществ растительного происхождения, которые могут активировать работу генов *SIRT*. Некоторые из этих модуляторов уже проходят клинические испытания (см. раздел 7.1).

Все эти наблюдения позволяют некоторым исследователям рассматривать гены семейства *Sirtuin* как главные регуляторные гены, контролирующие процессы старения у человека, осуществляющие координационную (надзорную) функцию не только над структурными генами (генами-рабами), но даже над многими регуляторными генами — транскрипционными факторами (генами-господами) [192]. Дальнейшие исследования этого интересного семейства покажут, действительно ли они играют главную роль в старении или являются, безусловно, важными, но отнюдь не уникальными генами, контролирующими этот сложный многоуровневый процесс. В частности, имеются некоторые данные, указывающие на возможную онкогенность гена *SIRT1*. Удивительно, но связь онкогенности и продолжительности жизни отмечена и для ряда других генов, таких как онкосупрессоры *P53* и *lgl* (дрозофила), а также уже упоминавшийся ранее ген *FOXO*. Гетерозиготность по этим генам блокирует развитие опухолей, гомозиготность — ускоряет процесс старения, по-видимому, за счет апоптоза и быстрого истощения запаса стволовых клеток.

В плане проблемы долгожительства особенно интересен ген *Nanog*, активация которого ведет к резкому омоложению клеток млекопитающих и человека и даже способствует их превращению в стволовые (родоначальные) клетки, что открывает широкие перспективы для направленного восстановления поврежденных органов и тканей [475].

7.3.1.2. Гены «слабого звена»

Вторая обширная группа генов, связанная с процессами старения, а точнее — с продолжительностью периода активного долголетия касается генов «слабого звена», которые, по сути, идентичны генам предрасположенности, многие из которых уже неоднократно упоминались и были описаны в главе 5, а также при рассмотрении соответствующих болезней в главе 6. Функционально ослабленные

Таблица 7.3.2

Гены долгожительства — старения. Популяционные исследования [42]

Ген гены (белок)	Мутация/ функция	Продолжительность жизни
Митохондриальная ДНК	<i>C150H, 517BA</i>	>
<i>BCL-2</i>	Антиапоптозный ген Белок митохондрий	>
<i>GH—IGF— rIGF</i>	Инсулиновый каскад: гормон роста — инсули- новый ростовой фактор — рецептор инсулинового ростового фактора	> <
<i>APOE</i> (аполипопротеин)	<i>E4/E4</i>	<
<i>APOA1</i>	<i>P</i> -аллель (генный парадокс)	> пожилые < молодой, средний возраст
<i>ALOX</i> (липоксигеназа)	Аллель 5 (<i>ALOX-5</i>)	<
<i>MTHFR</i> (метилентетра- гидрофолатредуктаза)	<i>C677T</i>	<
<i>ACE</i> (ангиотензинконвер- тирующий фермент)	<i>I/D Alu</i> -повтор	>
<i>PAI1</i> (ингибитор актива- ции плазминогена)	<i>675 4G/5G</i>	<
<i>PON</i> (пароксоназа)	<i>Gln192Arg</i>	<
<i>GSTM1; GSTT1</i> (глутати- он трансферазы M1 и T1)	Нулевые аллели 0/0	> пожилые < средний возраст
<i>NAT2, MYCL1, CYP17A1, CYP19A1, AR</i>	Различные мутации с + эффектом	< онкология
<i>IFNG</i> (интерферон-γ)	+874- <i>A</i> -аллель	> женщины
<i>IL10</i> (интерлейкин-10)	<i>1082 GG</i>	> мужчины
<i>TNFA</i> (фактор некроза опухоли)	–308 <i>G</i>	> мужчины

полиморфные варианты этих генов и их сочетания составляют основу всех мультифакториальных заболеваний человека [41].

В таблице 7.3.2 приведен сокращенный список генов человека, мутации которых, как было показано в многочисленных популяционных исследованиях, ассоциированы (сцеплены) с долгожительством.

Как показывают популяционные исследования анализа частот аллелей соответствующих генов в разных возрастных группах населения, такие гены весьма многочисленны и принадлежат к разным метаболическим системам организма. Так, положительный эффект на продолжительность жизни человека оказывают некоторые мутации митохондриальных генов (*C150H*, *517BA*), замедляющие процессы клеточного дыхания, а также антиапоптозный ген *BCL2*, белковый продукт которого делает более устойчивой к разрушению мембрану митохондрий (табл. 7.3.2). К таковым также относятся **гены системы детоксикации** (*GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*, *CYP2D6*, *CYP17A1*), ответственные за метаболизм всех ксенобиотиков, **гены липидного обмена** (*APOE*, *APOA1*, *APOB*, *ALOX-5*), определяющие состояние сосудов, **гены углеводного обмена** (*IGF*, *rIGF*), **гены, регулирующие сосудистый тонус и свертываемость крови** (*ACE*, *PAII*, *PON*, *MTHFR*), некоторые **гены иммунного ответа** (*IFNG*, *IL10*), **ростовых факторов** (*TNFA*, *TGFB*), ряд **онкогенов**, а также **гены, контролирующие уровень и метаболизм гормонов** (*PIT1*, *PROPI*, *GHR/BP*, *CYP19A1*). Дополнительную информацию об этих и других генах предрасположенности и соответствующих им аллелях можно получить в работах [34, 44, 84, 169, 170]. Упомянем только несколько «генетических парадоксов», отмеченных при популяционных исследованиях некоторых из перечисленных генов [84]. В частности, полиморфные варианты генов *IFNG*, *IL10*, *TNFA* обнаруживают положительную ассоциацию с долгожительством у индивидов только одного пола. Один из аллелей гена *APOA1* (P) имеет низкую частоту у молодых людей и лиц среднего возраста, но достаточно часто встречается у пожилых. Сходным образом «нулевые» аллели генов *GSTM1* и *GSTT1* явно недостаточно представлены у лиц среднего возраста, но достоверно чаще встречаются у пожилых и даже у столетних индивидов.

Аллельные варианты этих генов были выявлены как в популяционных исследованиях, так и при сравнительном анализе их частот у больных соответствующими хроническими болезнями и у здоровых индивидов. Мы вернемся к более детальному рассмотрению генов предрасположенности и их аллелей в следующей главе (см. главу 8).

Суммируя, можно отметить, что благодаря достижениям науки, и прежде всего генетики, стала очевидной решающая роль генома в процессах старения. Его наследственную основу составляют особые гены-регуляторы, получившие название генов старения (aging genes). Некоторые из таких генов-кандидатов уже идентифицированы. Изуче-

ние механизмов их действия и поиск других генов старения активно продолжаются.

7.3.2. Старение — прогрессивная дегенерация транскриптома

Объективно оценить вклад отдельных генов, генных семейств и целого генома можно только путем тщательного анализа их работы (экспрессии) на разных стадиях развития в норме и при патологии. Такие исследования были начаты сравнительно недавно, но имеющиеся уже результаты заслуживают самого серьезного внимания [764, 525]. Так, с помощью техники экспрессионных чипов были изучены особенности профилей экспрессии практически всех генов человека у 74 индивидов в возрасте 27–92 лет [764]. Объектом исследования были здоровые участки почек, удаленных по различным медицинским показаниям. Изменения характера экспрессии отмечались в 985 генах, из которых в 742 экспрессия возрастала, а в 343 — существенно уменьшалась. Гены, экспрессия которых достоверно менялась с возрастом, получили название **возраст-регулируемых генов (age regulated genes — ARG)** [764]. Возрастные экспрессионные профили ARG вполне соответствовали морфологическим и физиологическим изменениям в органе (почке). Любопытно, что в корковом и мозговом веществе почки экспрессионные профили частично перекрывались. Аналогичная зависимость была отмечена и при сравнении экспрессионных профилей разных органов. Так, из 447 ARG, проанализированных в почках, 227 ARG были обнаружены и в других тканях, и их экспрессия также менялась с возрастом. Похоже, что все ARG действуют в одном направлении. На этом основании был сделан вывод, что старение, действительно, связано не с целым геномом, а лишь с отдельными генами, набор которых в разных тканях может варьировать. Ослабление активности этих генов при старении должно вести к однотипному нарушению клеточных функций, что, в конечном счете, снижает специфическую функцию всего органа. Отсюда и следовал логичный вывод о том, что **старение — это медленное угасание транскрипционной активности, функциональная дегенерация всего генома**. Отмечено также, что экспрессионные профили у молодых людей, несмотря на очевидные различия генотипа, имеют значительно больше сходства, чем у пожилых. Нередко при этом экспрессионные профили не соответствуют реальному возрасту, то есть биологический возраст органа или ткани может не соответствовать хронологическому (ниже мы вернемся к этой интересной особенности).

Еще один важный вывод из этой работы заключается в том, что у человека возрастные экспрессионные профили резко отличаются от таковых у других видов животных, в том числе и у млекопитающих. Поэтому процессы старения человека необходимо изучать именно на человеке, а не на других видах. К сожалению, работ по экспрессионным профилям целого генома человека пока не много, однако они позволяют получить принципиально новую информацию о функции всего генома, отдельных генных семейств и факторах, влияющих на их экспрессию [162].

Полученные результаты находятся в хорошем соответствии с уже известными данными о том, что **биологический возраст человека и его отдельных органов отнюдь не тождественен хронологическому**, то есть абсолютному, возрасту. Каждый человек и каждый его орган живет и стареет по-своему [341]. Образно говоря, это означает, что человек в 50 лет может иметь уровень гормонов, соответствующий 40-летнему, кости — 70-летнему, мыслительные способности — 25-летнему возрасту и т. д. Человек — мозаика органов разного возраста. С помощью различных функциональных тестов, а также различных лабораторных исследований, прежде всего — гормонов, иммунных, нейроэндокринных факторов, ультразвука и методов денситометрии и других, удастся выяснить состояние возрастных маркеров различных органов и систем организма. Уже разработана принципиальная усредненная таблица возрастных оптимумов различных систем, после которых начинается физиологическое возрастное торможение функции — пауза (табл. 7.3.3).

По типу **менопаузы** (40 лет) выделяют **кардиопазу** (50 лет), **гастропазу** (40 лет), **дермапазу** (35 лет), **пульмопазу** (50 лет) и т. д. Такие физиологические оптимумы и «паузы» существуют и для всех эндокринных желез, главных нейротрансмиттеров мозга (**биопауза** — дофамин, ацетилхолин, ГАМА, серотонин — 60 лет), для оценки работы мозга (**электропауза** — 45 лет), органов чувств (**сенсорная пауза** — 40 лет) и даже эффективности ДНК-репарации (**генопауза**). Естественно, что некоторые из этих «пауз» выделены довольно искусственно и нуждаются в уточнении с помощью методов прямой оценки генной экспрессии. По понятным причинам, сделать это на человеке не представляется возможным. Важно, однако, подчеркнуть, что наиболее продвинутые по шкале биологического возраста органы и системы являются «слабым звеном» и именно они, скорее всего, и будут главными кандидатами ускоренного старения и хронических болезней. Чем мож-

Таблица 7.3.3

Средний возраст начала угасания функциональной активности различных органов и систем организма [341]

Орган/система/ пауза	Маркер старения	Начало угасания активности (годы)
Менопауза	Эстрогены, прогестерон	40
Гастропауза	Всасывание пищи	40
Пульмопауза	Эластичность ткани легких, повышение нижнего артериального давления	50
Тимопауза	Размеры железы, состояние иммунной системы	40
Кардиопauses / васкулопауза	Объем выброса крови, показания кровотока	50
Остеопauses	Минеральная плотность кости	30
Нефропауза	Уровень эритропоэтина, клиренс креатинина	40
Сенсорная пауза	Слух, зрение, тактильная чувствительность, обоняние	40
Биопauses	Нейротрансмиттеры	Допаминовая система — 30 Ацетилхолиновая — 40 γ-аминомасляная — 50 Серотониновая — 60
Шишковидная железа/ пинеальпауза	Мелатонин	20
Тиропауза	Кальцитонин, тироксин	50
Адренопауза	Тестостерон, DHEA	55
Инсулинопауза	Толерантность к глюкозе	40
Дермапауза	Коллаген, синтез витамина D	35

но объяснить наличие таких слабых звеньев? Логичный ответ только один — **присутствием в них функционально активных генов предрасположенности**. Последние, как известно, определяются как аллельные варианты генов, которые совместимы с пре- и постнатальным развитием, но в неблагоприятных условиях являются причиной различных хронических мультифакториальных заболеваний [30]. В каждой клетке содержится один и тот же геном, но в разных органах и тканях функционируют разные гены и, соответственно, имеется разный паттерн ARG

(см. выше) и генов предрасположенности. Возможно, но необязательно, что многие из них совпадают.

Таким образом, **старение — процесс сугубо индивидуальный как в отношении всего организма в целом, так и его отдельных органов, тканей и систем в частности. Различие биологического возраста органов, тканей, систем имеет генетическую основу и определяется присутствием в них функционально неполноценных генов предрасположенности, в том числе и собственных ARG.**

7.3.3. Старение и пути борьбы за активное долголетие

Как следует из вышеизложенного, после расшифровки генома человека, а также геномов многих лабораторных животных, **генетика старения превратилась в бурно развивающуюся область современной геронтологии и молекулярной медицины.** Не вызывает сомнения и то, что реально воздействовать на процессы старения с целью увеличения периода активного долголетия можно **как путем качественного улучшения условий жизни, так и с помощью направленного воздействия на геном с целью коррекции его функциональной активности.** Причем оба эти направления, как становится все более очевидным, тесно взаимосвязаны [477].

Принципиально существуют и активно разрабатываются следующие практические подходы для борьбы со старением и достижения максимальной продолжительности периода активного долголетия:

- 1) модуляция активности генов долголетия — геропротекторов (адаптогены, гормоны), биологически активных пептидов (цитокины);
- 2) нейтрализация эндотоксинов (антиоксиданты, хелатные агенты, комплексоны);
- 3) досимптоматическая профилактика распространенных мультифакториальных болезней путем создания условий «непроявления» функционально неполноценных аллелей — «жизнь в гармонии со своими генами».

В гериатрии (клинической геронтологии) уже существуют и широко используются различные лекарственные препараты (антиоксиданты, адаптогены, гормоны, биопептиды — цитокины), нейротропные средства, хелатные агенты и комплексоны, избирательно влияющие и устраняющие экзо- и эндотоксины, корректирующие уже начавшиеся патологические процессы, нормализующие гормональный фон и таким образом способствующие увеличению продолжительности жизни [15, 78, 210].

Определенные успехи в плане активного долголетия достигнуты и в области прикладной геронтологии, за которой закрепилось название **медицины антистарения**, в задачу которой входит **использование передовых научных и практических технологий для раннего выявления, предотвращения, лечения и даже обратного развития болезней, связанных с возрастом**. Важное место в современной медицине антистарения отводится генетическим исследованиям [41, 314].

Естественно, что именно современная генетика открывает недоступные ранее возможности для направленного воздействия на геном человека, для достижения активного долголетия и успешной борьбы со старостью. Сейчас уже ясно, что все ныне используемые геропротекторы, равно как и эмпирические факторы, влияющие на продолжительность жизни, прямо или косвенно регулируют работу генов.

Возможности направленного воздействия непосредственно на уже известные гены старения (ARG) все еще весьма ограничены. Большинство известных геропротекторов работают на уровне белковых продуктов, и их применение следует отнести скорее к заместительной терапии (например гормональные препараты, комплексоны, антиоксиданты и др.). Непосредственно на активность генов, скорее всего, влияют только биопептиды (цитокины), некоторые из них могут связываться с промоторными последовательностями генов старения и индуцировать их экспрессию [539]. Активно разрабатываются и средства направленного воздействия на экспрессию главных генов-регуляторов старения (ARG) (см. 7.3.1).

Значительно более продвинутой и перспективной представляется область воздействия на качество здоровья через гены предрасположенности, мутации которых способствуют развитию тяжелых мультифакториальных заболеваний. **«Никто из нас генетически не совершенен, и по мере прогресса генетических исследований каждый оказывается предрасположенным к тому или иному заболеванию»** (Фрэнсис Коллинз, директор Международной программы «Геном человека») [361]. В настоящее время тестирование генов предрасположенности составляет методологическую основу нового направления — **предиктивной (предсказательной) медицины**, цель которой — раннее выявление наследственной предрасположенности человека к хроническим заболеваниям, их предупреждение на досимптоматическом этапе развития, разработка индивидуальных методов профилактики и лечения [32, 39]. Разделами предиктивной медицины, имеющими непосред-

ственное отношение к процессам старения, являются **фармакогеномика** (см. 7.2.), **нутригеномика** (см. 7.1), **токсикогеномика**, **экогенетика** (взаимодействие с генами различных токсинов, промышленных и сельскохозяйственных ядов), **психогенетика** (индивидуальные реакции на психологический стресс и другие социальные факторы). Значение этих направлений в борьбе со старением детально рассмотрено в наших предыдущих работах [41, 44, 314, 315]. Отметим только, что в настоящее время накоплена обширная информация по генам предрасположенности, определяющим наследственную подверженность человека самым разным, прежде всего наиболее распространенным хроническим заболеваниям. Так, подробно изучены генные сети и особенности полиморфизма главных генов предрасположенности к сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям, тяжелым заболеваниям легких, костей, многим гинекологическим и акушерским заболеваниям, диабету, атеросклерозу и пр. Информацию по этим нозологиям можно получить в других главах данной монографии.

Сформулировано и уже находит практическое применение в медицине антистарения представление о **генетическом паспорте** (см. главу 8). Разрабатываются и внедряются специальные генетические паспорта для беременных, спортсменов, лиц экстремальных профессий. Нет сомнения, что тестирование полиморфизма генов липидного обмена, ренин-ангиотензиновой системы, коагуляции и клеточной адгезии, рецепторов нейромедиаторов, обмена кальция и иммуномодуляторов в рамках индивидуального генетического паспорта напрямую связано с решением проблемы активного долголетия. Именно с помощью тестирования этих генов удастся разрабатывать индивидуальные профилактические программы, направленные прежде всего на улучшение качества и продолжительности жизни. Подробно о возможностях генетического тестирования и разработках индивидуальных программ профилактики можно познакомиться в серии наших монографий и обзоров [30, 40, 44, 167].

Естественно, что конечной целью профилактики тяжелых хронических заболеваний и борьбы с «реальными» причинами смерти является гарантированное активное долголетие человека. Бесспорные успехи медицины антистарения основаны, главным образом, на эффективном применении уже накопленного человечеством эмпирических знаний. На сегодня твердо доказанными факторами, увеличивающими продолжительность жизни, являются ограничение калорийности пищи,

применение антигериатрических препаратов, сбалансированное рациональное питание, хорошее медицинское обслуживание, своевременный активный отдых, умеренные физические упражнения и занятия спортом. Дальнейший прогресс в этом направлении определяется только успехами направленного научного поиска. В частности, по нашему мнению, уже сегодня вполне реально провести молекулярно-генетическое тестирование известных генов предрасположенности всех основных жизненно важных систем организма, включая генные сети сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной, костной, мышечной и других.

На основании полученных результатов можно выяснить слабое звено этой цепи, то есть орган или систему, наиболее подверженную старению и болезням, и предложить упреждающие, досимптоматические меры профилактики. Последние, в первую очередь, касаются образа жизни, питания, привычек и пр. Достаточно отметить, что, согласно данным по нутригеномике, правильное, индивидуально подобранное питание позволяет увеличить продолжительность активной жизни в среднем на 14 лет [44, 314].

Нет сомнения в том, что вышеупомянутые эмпирические факторы, позитивно влияющие на активное долголетие и процессы старения, могут и должны стать много эффективнее, если их подбор и способ применения будут основываться на особенностях индивидуального генома человека [44].

Таким образом, основные надежды в противодействии старению сегодня возлагаются на исследования генома человека и способы направленной регуляции генной экспрессии. Кстати, именно успешное решение этой проблемы с помощью малых ядерных ДНК и было удостоено Нобелевской премии за 2006 год. В настоящее время учеными Западной Европы разработан и уже успешно реализуется крупнейший в мире проект — GENA (Genetics of Healthy Aging — Генетика здорового старения). Проект объединяет 11 стран и направлен на изучение генов-кандидатов, участвующих в процессах старения и влияющих на продолжительность жизни. Для реализации проекта отобрано 5300 долгожителей и 2650 молодых людей в качестве контрольной группы. Проект рассчитан на 4 года, и его результаты будут опубликованы.

Благодаря стремительному прогрессу молекулярно-биологических методов, в 2010 году, согласно научным прогнозам авторитетных ученых, станет реальным секвенирование всего генома человека за 1000 \$ [214]. Получение такой информации снимет необходимость каких-либо

выборочных генных тестирований, но потребует серьезного компьютерного обеспечения для анализа уникального генетического портрета каждого человека со всеми возможными мутациями, вызывающими генные болезни, или полиморфизмом, предрасполагающим к мультифакториальной патологии.

Человечество вступает в эру персонифицированной медицины, основанную на знании индивидуального генома [214]. Благодаря генетическому тестированию уже в недалеком будущем станет возможным отдалить возраст болезней старения в среднем на 5–7 лет. Для достижения этой цели только в США в 2007 году было выделено около 3 млрд долларов на фундаментальные исследования процессов старения, изучение и разработку путей эффективной профилактики возрастных болезней. Появление уникальной технологии направленной регуляции работы индивидуальных генов с помощью малых ядерных и интерферирующих РНК позволяет надеяться, что именно благодаря геномике будут достигнуты решающие успехи в борьбе за активное долголетие человека.

Заключение

На современном уровне наших знаний правомерен вывод о том, что старение является результатом общего снижения функциональной активности работающей в каждой клетке транскрибируемой части генома — **транскриптома**, следствием чего являются возрастные нарушения органов и тканей. При этом каждый орган имеет свой возраст, контролируемый генами старения (ARG), и зависит от функционального состояния генов предрасположенности. Весь организм в целом представляет собой мозаику, состоящую из органов и тканей, имеющих разный биологический и функциональный возраст. У каждого человека в силу такого мозаицизма имеется метаболическая система или орган, наиболее подверженные болезни, — теория «слабого звена». Тестирование генов «биологических часов» и маркерных генов, ассоциированных с мультифакторными заболеваниями, позволяет судить о наследственной компоненте (составляющей) здоровья каждого человека.

Решающий прогресс в борьбе за активное долголетие и продолжительность жизни может быть достигнут путем минимизации повреждающего действия факторов внешней среды и создания оптимальных условий для сохранения и работы генома. Эффективным в борьбе

с повреждающими экзогенными факторами и эндотоксинами является использование антиоксидантов и препаратов, нейтрализующих экзо- и эндотоксины (хелатные агенты, комплексоны). Нормализация активности генов долголетия достигается ограничением калорийности питания, а также с помощью соответствующих геропротекторов (адаптогены, витамины, гормоны, биологически активные пептиды — цитокины). Досимптоматическая профилактика частых мультифакториальных болезней особенно эффективна только при условии тестирования маркерных генов, ассоциированных с мультифакториальными заболеваниями, и их профилактики путем создания условий непроявления функционально неполноценных аллелей с помощью индивидуально подобранной диеты и рационального образа жизни. Главный лозунг сохранения активного долголетия сегодня — «Жить в гармонии со своими генами!»

7.4. СПОРТИВНАЯ ГЕНЕТИКА

Введение

Анализируя результаты крупных мировых соревнований и не лучшие для России итоги Олимпийских игр в Пекине в августе 2008 года, становится очевидным, что необходима модернизация медико-биологического обеспечения спортивной деятельности с использованием современных научных достижений на всех уровнях и во всех регионах России. В первую очередь это касается молекулярно-генетических технологий, с использованием которых многие спортсмены, тренеры и организаторы спорта связывают дальнейший прогресс спортивных достижений и успехи спортивной науки.

Применение современных молекулярно-генетических методов позволяет выявить индивидуальные особенности организма человека. Поэтому генетическое тестирование на любом этапе спортивной подготовки может дать первичную информацию тренерам для более рационального подбора кандидатов и индивидуальных программ тренировки спортсменов. Немаловажное значение имеет и разработка индивидуального подхода к восстановлению формы спортсмена после соревнований и периода усиленных тренировок. Известно, что разные люди по-разному и с разной скоростью воспринимают тренировочные нагрузки. Кому-то свойственна быстрая адаптация, кто-то восстанавливается медленнее. Большинство этих процессов так или иначе связано с индивидуальными генетическими особенностями организма.

Многочисленные исследования свидетельствуют об индивидуальных способностях человека к выполнению различных физических упражнений, о наследственной предрасположенности к тем или иным видам спорта [24, 752]. По мере углубления знаний о молекулярной структуре генома человека и благодаря расшифровке первичной ДНК-последовательности стал возможным направленный поиск генетических маркеров предрасположенности к развитию и проявлению физических качеств. В настоящее время имеется информация почти о 150 различных генах, контролирующих физические способности человека, важных для правильного занятия фитнесом и для отбора потенциально перспективных кандидатов для профессионального спорта [281, 752].

Стремительный рост данных о генетических маркерах физических способностей человека закладывает основы принципиально новой системы медико-генетического обеспечения физической культуры и спорта — **спортивной генетики**, которая позволит поднять эту важную сферу жизнедеятельности человека на более высокий уровень. Именно спортивная генетика ускорит внедрение в практику достижения предиктивной и индивидуальной медицины, позволит активно планировать и своевременно корректировать тренировочный процесс [24].

7.4.1. Общие представления о генетических маркерах, ассоциированных с физическими качествами человека

Первые попытки использовать генетические методы в спорте были предприняты в 1968 году на Олимпиаде в Мехико. В дальнейшем, в Монреале в 1976 году, группа канадских ученых продолжила исследования в поисках генетических различий между участниками Олимпийских игр и людьми, не занимающимися спортом. В качестве генетических маркеров использовали легко определяемые устойчивые признаки организма, тесно связанные с генотипом и отражающие наследственные задатки отдельных индивидов [179]. Среди них выделяют следующие группы маркеров:

- комплекс морфологических признаков, включающий в себя пропорции тела, форму скелетных мышц и их топологический состав, степень жировотложения;
- группы крови, включающие в себя системы эритроцитарных антигенов — ABO, и лейкоцитарных антигенов — HLA;
- дерматоглифы — узоры на подушечках пальцев рук и ног;
- состав мышечных волокон и их распределение по трем типам в соответствии с метаболическим профилем;

- гормональный профиль и содержание гормонов в крови.

Последние данные, полученные в ходе молекулярно-генетических исследований, открыли новые возможности в разработке и применении диагностических комплексов, направленных на решение проблем медико-генетического отбора в спорте, а также на оптимизацию тренировочного процесса [123, 752].

К 2005 году была получена информация почти о 150 различных генах, контролирующих физическое развитие человека [281]. Подробный сравнительный анализ частот аллелей этих генов у разных групп спортсменов позволил идентифицировать гены-кандидаты, ассоциированные с различными физическими качествами человека.

Так, среди полиморфных сайтов, имеющих отношение к физическим способностям человека и к спорту, уже сейчас можно выделить следующие: I/D-полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*) [179, 740], R577X-полиморфизм гена альфа-актина-3 (*ACTN3*) [180, 813], C34T-полиморфизм гена АМФ-деаминазы (*AMPD1*) [180, 630], полиморфные сайты альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (*PPARA*) и 1-альфа-коактиватора гамма-рецептора (*PGC1A*). Много работ посвящено исследованию гена рецептора витамина D (*VDR*), гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*) и гена миостатина (*MSTN*) [11, 180].

При этом выделяют аллели, ассоциированные с выносливостью (кардиореспираторной и/или мышечной), скоростно-силовыми качествами (быстроты, взрывной или абсолютной силы), а также с развитием гипертрофии скелетных мышц. Так, считается, что аллель *I* гена *ACE* и аллель *G* гена *PPARA* могут способствовать достижению высоких результатов в видах спорта на выносливость (аллели выносливости), а аллели *D* и *C* тех же генов — как аллели скорости и силы [180]. К ним следует добавить благоприятные в любом отношении (как скорости/силы, так и выносливости) аллели *R* гена *ACTN3*, *Gly* гена *PGC1A* и *C* гена *AMPD1*. Другие аллели этих же генов ассоциируются с пониженной физической работоспособностью [180, 813]. Имеются данные об ассоциации генов альфа-2-адренорецептора *ADRA2A* (аллель 6.7 kb) и гаплогруппы Н митохондриальной ДНК (mtDNA Н) с выносливостью, а гаплогрупп К и J2 митохондриальной ДНК (mtDNA К и J2) — с ограниченной физической работоспособностью [752].

Необходимо отметить, что после опубликования генетической карты физической активности версии 2005 года произошло значитель-

ное расширение спектра генов, полиморфизм которых ассоциирован с предрасположенностью к тому или иному виду спорта, что связано с возросшей активностью молекулярно-генетического тестирования в ряде лабораторий институтов физической культуры и спорта как у нас в стране, так и за рубежом [24, 752].

Перечень генов и их аллелей, ассоциированных с выносливостью и силой (скоростью), представлен в таблицах 7.4.1 и 7.4.2.

Идентифицированы также аллели, ассоциированные с ограниченной физической активностью человека в результате снижения или повышения экспрессии соответствующих генов-кандидатов. Наличие таких аллелей коррелирует с прекращением роста спортивных результатов либо осложняется развитием таких патологических состояний, как гипертрофия миокарда левого желудочка (ГМЛЖ), сердечная недостаточность, аритмии, а в ряде случаев может быть причиной внезапной смерти.

Поиск полиморфных генов-кандидатов, ассоциированных с наследственной предрасположенностью к выполнению различных физических нагрузок, основан на знании молекулярных механизмов мышечной или любой другой деятельности и предположении о том, что полиморфизм гена-кандидата может влиять на уровень метаболических процессов [180].

При исследовании ассоциаций используется несколько подходов: 1) сравнение частот генотипов и аллелей по определенному гену у спортсменов и в контрольной группе. Если частота одного из аллелей или генотипа значительно выше, например в группе стайеров, по сравнению с контрольной группой или с группой спринтеров, данный аллель/генотип считается благоприятствующим проявлению выносливости (**аллель/генотип выносливости**); 2) корреляционный анализ между генотипами и уровнем физической подготовленности или соревновательной успешностью. В данном случае определяются генотипы, ассоциированные с наивысшими, средними и наименьшими показателями. В дополнение к этому сравнивают частоты генотипов и аллелей у спортсменов с наивысшими и наименьшими показателями; 3) корреляционный анализ между генотипами и приростом различных показателей в процессе длительных тренировок (исследование в динамике). При поиске генов-кандидатов, ассоциированных с физическими способностями человека, применяются стандартные методы генетического анализа, включая картирование локусов количественных признаков (Quantitative Trait Loci). В последнее время благодаря появ-

Таблица 7.4.1

Список генов-кандидатов и их аллелей, ассоциированных с проявлением выносливости у спортсменов [24]

№	Ген	Полиморфизм	Аллели выносливости
1	<i>ACE</i>	I/D	<i>I</i>
2	<i>ACTN3</i>	R577X	<i>X</i>
3	<i>ADRA2A</i>	6.7/6.3 kb	<i>6.7 kb</i>
4	<i>ADRB2</i>	Arg16Gly	<i>Arg</i>
		Gln27Glu	<i>Gln</i>
5	<i>AMPD1</i>	C34T	<i>C</i>
6	<i>BDKRB2</i>	+9/-9	<i>-9</i>
7	<i>CNB</i>	5I/5D	<i>5I</i>
8	<i>FABP2</i>	D4S1597	<i>D4S1597</i>
9	<i>HIF1A</i>	Pro582Ser	<i>Pro</i>
10	<i>EPAS1</i>	A/G интрон 1	<i>G</i>
		C/T интрон 1	<i>T</i>
11	<i>EPOR</i>	(GGA)n	<i>185 bp</i>
12	<i>MB</i>	A79G экзон 2	<i>A</i>
13	<i>MYF6</i>	C964T	<i>T</i>
14	<i>NFATC4</i>	Ala160Gly	<i>Gly</i>
15	<i>NOS3</i>	(CA)n	<i>164 bp</i>
		Glu298Asp	<i>Glu</i>
		5/4	<i>5</i>
16	<i>PGC1A</i>	Gly482Ser	<i>Gly</i>
17	<i>PGC1B</i>	Ala203Pro	<i>Pro</i>
18	<i>PPARA</i>	G/C интрон 7	<i>G</i>
19	<i>PPARD</i>	+294T/C	<i>C</i>
20	<i>SLC9A9</i>	D3S1569	<i>D3S1569</i>
21	<i>TFAM</i>	Ser12Thr	<i>Thr</i>
22	<i>UCP1</i>	D4S1597	<i>D4S1597</i>
23	<i>UCP2</i>	Ala55Val	<i>Val</i>
24	<i>UCP3</i>	-55C/T	<i>T</i>
25	<i>VEGF</i>	G-634C	<i>C</i>
		C-2578A	<i>C</i>
26	<i>Y-DNA</i>	Гаплогруппы	<i>E*, E3*, K*(xP)</i>
			Отсутствие <i>E3b1</i>
27	<i>mtDNA</i>	Гаплогруппы	L0
			Отсутствие <i>L2</i>
			Отсутствие <i>T</i>
			<i>H</i>
			Отсутствие <i>K, J2</i>

Таблица 7.4.2

Список генов-кандидатов и их аллелей, ассоциированных с предрасположенностью к быстрой реакции, силе и координационным способностям спортсменов [24]

№	Ген	Полиморфизм	Аллели силы/скорости
1	<i>ACE</i>	I/D	<i>D</i> , быстрота, сила
2	<i>ACTN3</i>	R577X	<i>R</i> , быстрота, сила
3	<i>AR</i>	(CAG) <i>n</i>	22, быстрота, сила
4	<i>AVPR1</i>	Гаплогруппы в промоторе	<i>RS1</i> , координация
			<i>RS3</i> , координация
5	<i>AMPD1</i>	C34T	<i>C</i> , быстрота, сила
6	<i>HIF1A</i>	Pro582Ser	<i>Ser</i> , быстрота, сила
7	<i>MYF6</i>	C964T	<i>C</i> , быстрота, сила
8	<i>NFATC4</i>	Ala160Gly	<i>Gly</i> , быстрота, сила
9	<i>PGC1A</i>	Gly482Ser	<i>Ser</i> , быстрота, сила
10	<i>PGC1B</i>	Ala203Pro	<i>Pro</i> , быстрота, сила
11	<i>PPARA</i>	G/C интрон 7	<i>C</i> , быстрота, сила
12	<i>PPARG</i>	Pro12Ala	<i>Ala</i> , быстрота, сила
13	<i>UCP2</i>	Ala55Val	<i>Ala</i> , сила
14	<i>SERT</i>	VNTR (10/12)	12 <i>rpt</i> , координация
		S/L-промотор	<i>S</i> , координация

лению метода общегеномного скрининга ассоциаций, появилась реальная возможность детального анализа особенностей геномного профиля однонуклеотидных замен (SNP) не только при различных хронических заболеваниях, но и у лиц, занимающихся тем или иным видом спорта. Такой подход, безусловно, окажется эффективным и для идентификации генов-кандидатов и генных локусов, ассоциированных с физическими особенностями человека, его наследственной предрасположенностью к спорту и фитнесу.

7.4.2. Гены-кандидаты мышечной силы

Скелетные мышцы человека состоят из трех основных типов мышечных волокон, различающихся своими сократительными и метаболическими характеристиками [24].

I. «Медленные» мышечные волокна (MB) — медленно сокращаются, медленно утомляются, преобладает анаэробный гликолиз.

IIa. «Промежуточные» мышечные волокна (ПВ) — быстро сокращаются, медленно утомляются, смешанный аэробно-анаэробный гликолиз.

IIд/х. «Быстрые» мышечные волокна (БВ) — быстро сокращаются, быстро устают, преобладает аэробный гликолиз.

Ключевым признаком, определяющим тип мышечного волокна, является молекулярная организация миозина. Миозин различных типов мышечных волокон существует в различных молекулярных изоформах и состоит из легких и тяжелых цепей. Тяжелые цепи миозина (ТЦМ) образуют толстые филаменты в саркомерах. ТЦМ мышечных волокон взрослого человека представлен тремя основными изоформами: ТЦМ I типа преобладает в МВ, кодируется геном *MYH7*, ТЦМ IIa типа присутствует в IIa волокнах, кодируется геном *MYH2* и ТЦМ IIх типа преобладает в БВ, кодируется геном *MYH1* [24].

По составу мышечных волокон с большой долей вероятности можно определить предрасположенность к физической деятельности. Результаты биопсии скелетных мышц высококвалифицированных спортсменов свидетельствуют о преобладании МВ у стайеров, а БВ — у спринтеров/силовиков [24]. Следовательно, состав мышечных волокон является значимым маркером предрасположенности к проявлению локальной (мышечной) работоспособности.

Первым полиморфизмом, для которого была показана связь со структурой мышечных волокон, был **I/D-полиморфизм гена ACE**. Установлено, что для лиц с генотипом *I/I* характерно более высокое относительное содержание медленных волокон ($50,1 \pm 13,9\%$) и низкое содержание быстрых волокон ($16,2 \pm 6,6\%$) по сравнению с таковым при наличии генотипа *D/D* ($30,5 \pm 13,3\%$ и $32,9 \pm 7,4\%$) [24]. Данный факт подтверждает роль I/D-полиморфизма гена ACE в детерминации как локальной, так и общей физической работоспособности (см. раздел 7.4.3).

Важнейшими регуляторами мышечной силы являются **гены транскрипционных факторов семейства PPAR и PPGC1A**.

Гены семейства PPAR — гены рецепторов активации пролиферации пероксисом — кодируют белки PPAR α , PPAR γ и PPAR δ , которые специфически связываются с промоторами генов жирового и углеводного обменов и регулируют их транскрипцию.

Гены, кодирующие эти белки, обозначаемые как *PPARA*, *PPARG* и *PPARD* соответственно, локализованы на разных хромосомах, но в целом имеют сходную молекулярную структуру [384].

Ген *PPARA* локализован на хромосоме 22 (22q13.31), экспрессируется в тех тканях, где происходит усиленный обмен жиров: мышцы, печень, сердце и бурый жир. В мышцах ген *PPARA* экспрессируется в 7 раз сильнее, чем в жировой ткани [402].

Основная функция белка *PPAR α* — регуляция обмена липидов, глюкозы и энергетического гомеостаза, а также веса тела посредством регуляции экспрессии генов, вовлеченных в пероксисомное и митохондриальное окисление. Экспрессия гена *PPARA* тканеспецифична и обуславливает наличие как минимум 6 альтернативных вариантов белка *PPAR α* [353]. При физических нагрузках аэробного характера происходит увеличение утилизации жирных кислот (ЖК) за счет повышения экспрессии гена *PPARA* и каскада регулируемых им генов, что в итоге улучшает окислительную способность скелетных мышц [402]. Известно, что при низкой экспрессии гена *PPARA* способность тканей к эффективному β -окислению ЖК падает и метаболизм тканей переключается на гликолитический способ получения энергии. Напротив, сверхэкспрессия гена *PPARA* приводит к снижению утилизации глюкозы и к повышению окисления ЖК [236]. Белок *PPAR α* можно рассматривать как переключатель энергетического метаболизма миокарда: главным источником энергии в миокарде плода является окисление глюкозы, а у новорожденного после активации гена *PPARA* ведущую роль в энергообеспечении мышцы сердца начинает играть окисление ЖК [655].

Среди изученных вариантов полиморфизма *PPARA* можно выделить G/C-полиморфизм 7 интрона (rs4253778), а также C/G-полиморфизм 5 экзона, приводящего к замене лейцина на валин в аминокислотном положении 162 (L162V). Показано, что 162V-аллель при отсутствии лигандов ассоциирован с низкой экспрессией *PPARA*, а при их наличии экспрессия мутантного *PPARA* в 5 раз выше, чем экспрессия *PPARA* «дикого» типа. Согласно клиническим данным, 162V-аллель ассоциирован со сниженным индексом массы тела, но увеличивает риск болезни Альцгеймера и метаболического синдрома [690].

Замена нуклеотида G на C в положении 2528 (7 интрон) ведет к снижению экспрессии гена *PPARA*, вследствие чего нарушается регуляция липидного и углеводного обменов. Установлено, что носители C-аллеля имеют высокий риск развития атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа и ишемической болезни сердца [656]. После 8-недельной физической нагрузки, как показали ультразвуковые исследования, у молодых людей с генотипом G/C прирост массы левого желудочка сердца

оказался в 2 раза, а у *C/C*-гомозигот — в 3 раза большим, чем у лиц с генотипом *G/G* [428]. Предполагается, что гипертрофия миокарда левого желудочка (ГМЛЖ) при наличии *C*-аллеля связана со снижением экспрессии гена *PPARA* и, соответственно, с уменьшением окисления ЖК и повышением утилизации глюкозы в миокарде.

Носители *G*-аллеля гена *PPARA*, по всей вероятности, в большей степени предрасположены к видам спорта с преимущественным проявлением выносливости по сравнению с носителями *C*-аллеля. Действительно, частота *G*-аллеля оказалась значительно выше в группе стайеров по сравнению с таковой в контрольной группе и у спринтеров/силовиков. Кроме того, наличие *G*-аллеля коррелирует с преобладанием «медленных» мышечных волокон (тип MB) в *m. vastus lateralis* и ассоциировано с пониженным риском ГМЛЖ у спортсменов [690].

Интересно, что у спортсменов, занимающихся циклическими видами спорта с преимущественным проявлением выносливости, обнаружено достоверное снижение частоты аллеля *C* по сравнению с контрольной группой (8,8 против 16,5 %). С другой стороны, у спортсменов, занимающихся видами спорта с преимущественным проявлением скорости и силы, отмечено достоверное увеличение частоты аллеля *C* (27,2% против 16,5 %), как за счет гомо-, так и гетерозигот (генотипы *CC* и *GC* соответственно).

Исследования в области фитнеса показали, что наилучших результатов в снижении лишнего веса добивались индивиды с генотипом *GG* (ген *PPARA*) по сравнению с носителями генотипа *GC*. С другой стороны, носители генотипа *GC* чаще, чем носители генотипа *GG*, имели гиперстеническое телосложение и показывали более выраженные результаты в приросте силы при занятиях со штангой [24].

Ген *PPARG* локализован в локусе 3p25. В результате альтернативного сплайсинга с этого гена образуется 4 транскрипта, отличающиеся по 5' концам с разным количеством нетранслируемых экзонов: *PPARγ1*, *PPARγ2*, *PPARγ3* и *PPARγ4* [625]. Функции этого транскрипционного фактора заключаются в регуляции генов, связанных с аккумуляцией жира (синтез триглицеридов), дифференцировкой адипоцитов и миобластов, чувствительностью к инсулину, активностью остеобластов и остеокластов (регуляция роста) [722].

Наиболее изученным полиморфизмом гена *PPARG* является Pro12Ala-полиморфизм (rs1801282), вследствие которого происходит замена нуклеотида *C* на *G* в 34 положении экзона B, что приводит к за-

мещению пролина на аланин в аминокислотном положении 12 изоформы PPAR γ 2. Частота *Ala*-аллеля варьирует от 1 % у китайцев до 25 % у европейцев [733].

Наличие *Ala*-аллеля коррелирует со снижением активности PPAR γ 2, следствием чего является подавление липолиза в адипоцитах и снижение уровня циркулирующих свободных ЖК [334]. Мета-анализ 30 разных исследований с общей выборкой 19136 человек показал, что носители *Ala*-аллеля имеют больший индекс массы тела, чем *Pro/Pro* гомозиготы [583], труднее теряют вес при переходе на гипокалорийную диету, но быстро набирают лишний вес после прекращения соблюдения диеты [725].

Среди других фенотипических эффектов *Ala*-аллеля гена *PPARG* следует отметить повышение риска артериальной гипертензии и инфаркта миокарда [609].

Показано, что *PPARG Ala*-аллель указывает на предрасположенность к скоростно-силовым видам спорта. Такие мышцы в большей степени утилизируют глюкозу благодаря повышенной чувствительности к инсулину, который обладает анаболическим действием на скелетные мышцы [24].

Ген *PPARD* в плане спортивной генетики заслуживает особенного внимания. Ген локализован в локусе 6p21.1-p21.2, активно экспрессируется в жировой ткани и в медленных мышечных волокнах скелетных мышц [488]. Продукт гена — белок PPAR δ — регулирует экспрессию генов, вовлеченных в окисление ЖК и обмен холестерина.

Генами-мишенями транскрипционного фактора PPAR δ в мышечной ткани являются гены окислительного метаболизма, гены митохондриального дыхания и термогенеза, гены, определяющие функции медленных мышечных волокон (миоглобина, тропонина I медленного типа), гены транспорта и окисления ЖК в миокарде, в бурой и белой жировых тканях [317]. Лигандами PPAR δ выступают насыщенные и полиненасыщенные ЖК, конъюгированная линолевая кислота, синтетические и эндогенные эйкозаноиды [317]. Голодание и физические нагрузки повышают уровень циркулирующих эндогенных лигандов PPAR δ . Эти же стимулы увеличивают экспрессию *PPARD* и запускают механизмы адаптации скелетных мышц к физическим нагрузкам [261].

Среди аллельных вариантов гена *PPARD* наибольший интерес представляет +294T/C-полиморфизм нетранслируемой части 4-го экзона (rs2016520). Транскрипционная активность мутантного C-аллеля на 39 %

выше, чем у *T*-аллеля. Кроме того, замена нуклеотида Т на С приводит к образованию нового сайта связывания с транскрипционными факторами (*Sp-1*), усиливающего экспрессию *PPARD* [738]. Уровень окисления ЖК у носителей *C*-аллеля повышен. Его частота составляет 15,5% в шведской, 12,0% в финской и 18,6% в немецкой популяциях [738].

На основании данных о высокой транскрипционной активности *C*-аллеля можно предполагать, что *C*-аллель гена *PPARD* способствует большему катаболизму жиров и в определенной степени снижает риск развития ожирения. Частота этого аллеля выше в группе стайеров по сравнению с контролем. Отмечено преобладание «медленных» мышечных волокон (МВ) в *m. vastus lateralis* у спортсменов с длительным спортивным стажем [24].

Ген *PGC1A*

Интенсивность метаболических процессов в скелетных мышцах при длительных физических нагрузках значительно повышается за счет увеличения числа митохондрий и усиления окисления ЖК. Существенный вклад в это вносит ген *PGC1A*, кодирующий белок PGC-1 α , активность которого резко возрастает при повышенных потребностях в окислительном фосфорилировании субстратов [658]. Ген *PGC1A* локализован в локусе 4p15.1, экспрессируется преимущественно в скелетных мышцах (МВ), миокарде, в буром жире, в почках [426]. Его белковый продукт PGC-1 α является транскрипционным коактиватором многих ядерных рецепторов: PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , митохондриального транскрипционного фактора (Tfam), рецептора тиреоидного гормона, ретиноидных рецепторов, глюкокортикоидного рецептора, ядерных респираторных факторов 1 и 2 (NRF1, NRF2), α - и β -рецепторов эстрогена, фарнезил X-рецептора (FXR), прегнан X-рецептора (PXR), ядерного фактора печени 4 (HNF-4), X-рецептора печени (LXR), эстроген-зависимых рецепторов (ERR) [426].

Через соответствующие транскрипционные факторы PGC-1 α влияет на активность процессов адаптивного термогенеза (1), образование митохондрий и усиление окислительных процессов (2), относительное содержание МВ (3), секрецию инсулина (4), глюконеогенез, липогенез и хондрогенез (5) [426]. В свою очередь экспрессия гена *PGC1A* регулируется белками различных сигнальных путей, такими как CAMKIV, CREB, AMPK, p38 MAPK, кальциневрин A, MEF2, NRs, NRF-1, FOXO1, поддерживается собственным продуктом экспрессии (PGC-1 α) и оксидом азота (NO) [257].

В экспериментах показано, что ген *PGC1A* активируется сразу после рождения и участвует в переключении углеводного типа метаболизма на жировой ткани [692]. Голодание также способствует повышению экспрессии *PGC1A* в миокарде. Однако сверхэкспрессия *PGC1A* может привести к неконтролируемой пролиферации митохондрий в кардиомиоцитах, нарушению саркомерной структуры и развитию кардиомиопатии [692].

Среди многих вариаций в гене *PGC1A* особый интерес представляет замена нуклеотида G на A в положении 1444 экзона 8, которая приводит к замещению глицина на серин в положении 482 белка PGC-1 α (Gly482Ser, полиморфизм rs8192678). Аллель *482Ser* встречается с частотой 30–40%. Он ассоциирован со снижением уровня экспрессии гена *PGC1A*, уменьшением окислительных процессов и митохондриального биогенеза, с ожирением у мужчин, ведущих физически неактивный образ жизни [712]. Мета-анализ 3718 больных сахарным диабетом 2-го типа выявил ассоциацию *Ser*-аллеля с повышенным риском этой патологии [591].

В результате пока единственного исследования с участием высококвалифицированных испанских спортсменов, занимающихся видами спорта, требующими большой выносливости, была выявлена ассоциация *Gly482*-аллеля гена *PGC1A* с высокими показателями максимального потребления кислорода и, соответственно, с высокой физической работоспособностью. В то же время частота *Ser*-аллеля у этих спортсменов оказалась значимо ниже (29,1 % против 40,0%) по сравнению с таковой в контрольной группе [691]. Показано также, что *Gly482*-аллель ассоциирован с увеличением числа МВ и чаще встречается в группе стайеров (длинные дистанции), а *Ser482*-аллель — в группе спринтеров (короткие дистанции) (табл. 7.4.3).

Основные ассоциации аллелей генов *PPARA*, *PPARG*, *PPARD* и *PGC1A* с индивидуальными физическими способностями суммированы в таблице 7.4.4. Так, по результатам исследований в трех независимых выборках *G*-аллель *PPARA* можно рассматривать как маркер предрасположенности к развитию и проявлению выносливости.

7.4.3. Гены сердечно-сосудистой системы

Основные гены-кандидаты, участвующие в регуляции сердечно-сосудистой системы человека в связи с физической деятельностью, представлены в таблице 7.4.5.

Таблица 7.4.3

Распределение генотипов и аллелей гена *PGC1A* у спортсменов с учетом вида спорта и квалификации [10]

Вид спорта	Разряд	n	Генотипы, %			P	482Ser-аллель, %	P
			<i>Gly/Gly</i>	<i>Gly/Ser</i>	<i>Ser/Ser</i>			
Академическая гребля	ЗМС/МСМК	14	50,0	50,0	0	0,058	25,0	0,024*
	МС	47	40,4	40,4	19,1	0,117	39,4	0,191
	КМС	11	18,2	45,4	36,4	0,419	59,1	0,292
	Все	72	38,9	43,1	18,0	0,114	39,6	0,142
Конькобежный спорт	ЗМС/МСМК	15	60,0	33,3	6,7	0,017*	23,3	0,012*
	МС	14	28,6	50,0	21,4	0,918	46,4	0,927
	Все	29	44,8	41,4	13,8	0,104	34,5	0,078
Все спортсмены		101	40,6	42,6	16,8	0,044*	38,1	0,054
Контрольная группа		113	24,8	55,7	19,5	1,000	47,3	1,000
<p>* — $P < 0,05$ — значимые различия по критерию хи-квадрат. Сокращения: ЗМС — заслуженный мастер спорта, МСМК — мастер спорта международного класса, МС — мастер спорта, КМС — кандидат в мастера спорта</p>								

Главные направления этих исследований связаны с генами ренин-ангиотензиновой системы [498, 740]. Белковые продукты генов данной системы участвуют в регулировании артериального давления и в поддержании водно-солевого баланса. Наиболее изученным генетическим маркером физической работоспособности является I/D-полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента (ACE), для которого выявлены ассоциации определенных генотипов и аллелей с физической нагрузкой. Так, среди бегунов на длинные дистанции и велосипедистов преобладает I/I-генотип, тогда как у бегунов на короткие дистанции, штангистов и пловцов — D/D [179].

В качестве генов-кандидатов, предрасполагающих к повышенной физической работоспособности, также рассматриваются гены ангиотензиногена (*AGT*), рецептора типа 1 к ангиотензиногену II (*AGTR1*) и эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) [518]. Гены *AGT* и *AGTR1* кодируют ангиотензиноген и рецептор типа 1 к ангиотензину II, а продукт гена *NOS3* — NO-синтаза — является ключевым ферментом регуляции тонуса кровеносных сосудов, работы гладкомышечной мускулатуры сосу-

Таблица 7.4.4

Ассоциации аллелей генов *PPARA*, *PPARG*, *PPARD* и *PGC1A* с различными показателями физической активности, данными эхографии сердца и составом мышечных волокон поперечно-полосатых мышц [24, 219]

Ген	Алель	Ассоциация с физической деятельностью	Ассоциация с данными эхокардиографии у спортсменов	Ассоциация с данными состава мышечных волокон
<i>PPARA</i>	<i>G</i>	Предрасположенность к развитию и проявлению выносливости	Ассоциация с нормальной геометрией ЛЖ, концентрическим ремоделированием ЛЖ и гипокинетическим типом кровообращения	Высокое содержание МВ
	<i>C</i>	Предрасположенность к развитию и проявлению скоростно-силовых качеств	Риск развития ГМЛЖ (по типу концентрической или эксцентрической гипертрофии), эукинетического и гиперкинетического типов кровообращения	Высокое содержание БВ*
<i>PPARG</i>	<i>Pro</i>	—	Риск развития ГМЛЖ (по типу концентрической или эксцентрической гипертрофии)*	Высокое содержание БВ*
	<i>Ala</i>	Предрасположенность к повышенной физической работоспособности	Ассоциация с гипокинетическим типом кровообращения	Высокое содержание МВ* и их большая ППС
<i>PPARD</i>	<i>T</i>	—	Ассоциация с нормальной геометрией ЛЖ, концентрическим ремоделированием ЛЖ	Высокое содержание БВ
	<i>C</i>	Предрасположенность к повышенной физической работоспособности	Риск развития ГМЛЖ (по типу концентрической или эксцентрической гипертрофии)	Высокое содержание МВ*
<i>PGC1A</i>	<i>Gly</i>	Предрасположенность к развитию и проявлению выносливости	Ассоциация с нормальной геометрией ЛЖ*, концентрическим ремоделированием ЛЖ* и гипокинетическим типом кровообращения*	Высокое содержание МВ*
	<i>Ser</i>	—	Риск развития ГМЛЖ (по типу концентрической или эксцентрической гипертрофии)*, эукинетического и гиперкинетического типов кровообращения*	Высокое содержание БВ*

*Статистически не значимые результаты с уровнем значимости, близким к $P = 0,05$.

МВ — «медленные» волокна, БВ — «быстрые» волокна, ЛЖ — левый желудочек, ГМЛЖ — гипертрофия миокарда левого желудочка; ППС — площадь поперечного сечения

Таблица 7.4.5

Гены-кандидаты регуляции сердечно-сосудистой системы человека [744]

Ген	Наименование гена	Локализация
<i>ACE</i>	Ангиотензинпревращающий фермент	17q23
<i>AGT</i>	Ангиотензиноген	1q42-q43
<i>AGTR1</i>	Рецептор типа 1 к ангиотензину 2	3q21-q25
<i>NOS3</i>	Синтаза окиси азота	7q36
<i>PPARA</i>	Альфа-рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом	22q13.31
<i>APOE</i>	Аполипопротеин Е	19q13.2
<i>BDKRB2</i>	Брадикинин рецептор В2	14q32.1-q32.2
<i>LPL</i>	Липопротеинлипаза	8q22
<i>GNB3</i>	Гуанин нуклеотид связывающий белок (G-белок)	12q13

дистой стенки и процессов тромбообразования [457]. Функционально близок к ним и ген метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), регулирующий обмен гомоцистеина в клетке. Полиморфизм генов *NOS3* и *MTHFR* ассоциирован с предрасположенностью к сердечно-сосудистым заболеваниям (см. раздел 6.5).

Ген *ACE* (ангиотензин-1 превращающий фермент — АПФ) картирован в локусе 17q23. Известно более 100 аллельных вариантов этого гена, из которых наиболее важным в отношении физической активности является I/D-полиморфизм http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusid=1636). У лиц с D/D-генотипом определяется максимальный уровень АПФ крови, с I/I-генотипом — уровень АПФ крови вдвое ниже, а у гетерозигот уровень фермента крови промежуточный [804].

Большое внимание уделяется изучению влияния мышечной деятельности на физиологические показатели организма в связи с различными аллельными вариантами *ACE*. Установлена высокая корреляция между увеличением массы левого желудочка сердца после тренировок на выносливость с повышенным уровнем АПФ в крови и генотипом D/D [498]. При силовой тренировке четырехглавой мышцы бедра (m. quadriceps) установлена ассоциация ее силы с аллелем D гена *ACE* [498]. В дальнейшем эти данные были подтверждены при измерении изометрической и изокинетической силы этой мышцы у носителей генотипа D/D [804]. Наблюдаемый эффект, по-видимому, зависел от разного соотношения «быстрых» и «медленных» мышечных волокон.

Таблица 7.4.6

Распределение генотипов *I/D* гена *ACE* у спортсменов, специализирующихся в видах спорта, требующих разных физических качеств [10, 180]

Физические качества	Количество спортсменов	Генотипы						Частота аллеля I, (%)
		<i>I/I</i>		<i>I/D</i>		<i>D/D</i>		
		n	%	n	%	n	%	
Выносливость	178	48	27*	87	49	43	24	51,5
Скорость–сила	170	40	24*	77	45	53	31*	46,5*
Смешанные	80	34	43	32	40	14	17	63
*P < 0,05 (по сравнению с 3 группой)								

У лиц с генотипом *D/D* соотношение МВ и БВ IIb типа было примерно одинаковым, тогда как у *I/I*-индивидов доминировали МВ [804].

Данные по распределению частот генотипов гена *ACE* у спортсменов разных видов спорта представлены в таблице 7.4.6.

Генотип *D/D* преобладал (31 %) у спортсменов, специализирующихся на скоростно-силовых видах спорта. Его частота снижалась до 24 % при видах спорта, требующих выносливости, — 24 % и у спортсменов смешанной группы — 17 % [180]. Сделан вывод, что спортсмены с генотипом *D/D* гена *ACE* в большей степени предрасположены к развитию скоростно-силовых физических качеств, а носители генотипа *I/I* — к выполнению длительной физической работы.

Ген эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) расположен в локусе 7q36, кодирует фермент — эндотелиальную NO-синтазу, который катализирует образование окиси азота (NO) из L-аргинина. *NOS3* играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов, в работе гладкомышечной мускулатуры сосудистой стенки и в процессах свертывания крови.

Основной полиморфизм гена — минисателлитный повтор в интроне 4 (ecNOS4b/4a), состоящий из 4 (4a) или 5 (4b) tandemных повторов размером 27 пар нуклеотидов. Аллель 4b встречается значительно чаще, чем аллель 4a. Прослеживается четкая связь между уровнем продукции NO, выраженностью окислительного стресса и синтезом NO под влиянием мышечной активности. Вместе с тем частота генотипа 4b/4b и аллеля 4b у спортсменов существенно выше, чем частота аллеля 4a. Среди представителей различных видов спорта (бокс, вольная и греко-римская борьба, горные лыжи, дзюдо, легкая атлетика, фристайл, хоккей и других спортивных игр) генотип 4a/4a вообще не

Таблица 7.4.7

Распределение генотипов *4a/4b* гена *NOS3* у спортсменов, специализирующихся в видах спорта, требующих разных физических качеств [23]

Физические качества	Количество спортсменов	Генотипы (%)		
		<i>4b/4b</i>	<i>4a/4b</i>	<i>4a/4a</i>
Выносливость	98	52*	42	5*
Скорость–сила	81	60	31	9*
Смешанные	61	70	30	0
*Р < 0,05				

зарегистрирован [10]. У спортсменов с преимущественным развитием выносливости частота генотипа *4b/4b* составила 52 %, а у спортсменов скоростно-силовых видов спорта она достигала 60 % (табл. 7.4.7). Пока трудно дать объяснение этому факту и требуются дополнительные обследования больших контингентов спортсменов.

Комплексный анализ генов сердечно-сосудистой системы (*ACE*, *AGT*, *AGTR2*, *Nos3*, *MTHFR*) проведен нами у 56 спортсменов-гребцов сборной команды Санкт-Петербурга. В качестве контроля использованы образцы ДНК 59 здоровых неродственных индивидов мужского пола в возрасте 18–45 лет, проживающих в Северо-Западном регионе России. В результате проведенных исследований не выявлено достоверных отличий частот генотипов или аллелей изученных генов сердечно-сосудистой системы у спортсменов-гребцов и в контрольной группе. Эти наблюдения доказывают, что гены, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями (см. раздел 6.5) не являются маркерами физической работоспособности в таком виде спорта, как гребля, которая требует от спортсмена сочетания скоростно-силовых качеств и выносливости (смешанная группа — табл. 7.4.7).

7.4.4. Гены метаболизма костной ткани

Белковые продукты генов метаболизма костной ткани играют важную роль при формировании определенного физиологического статуса человека. Гены метаболизма костной ткани и их продукты подробно рассмотрены в разделе 6.2.

У гребцов отмечено увеличение частоты генотипов *s/s* гена *COL1A1* и *t/t* гена *VDR*, ассоциированных с низкой минеральной плотностью костной ткани (4 и 0 % для *COL1A1* и 20 и 11 % для *VDR*), снижение частоты

генотипа *T/C* (защищающего от снижения минеральной плотности) гена *CALCR* (18 и 34 % соответственно). Однако статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей данных генов между группой гребцов и популяционной группой обнаружено не было [11].

7.4.5. Другие гены

Ген α -актина-3 (*ACTN3*) — первый ген структурного белка скелетных мышц α -актина-3, для которого показана связь с проявлением физических качеств спортсменов, а генотип по *ACTN3* — один из факторов, влияющих на нормальное функционирование мышц. Продукт гена *ACTN3* отвечает за синтез α -актина-3, являющегося основным компонентом Z-линий мышечных саркомеров, который определяет развитие быстрых мышечных волокон II типа. Ген *ACTN3* находится в длинном плече 11 хромосомы (11q13-q14), состоит из 20 экзонов и 19 интронов.

Значительное количество людей (6 % в Африке, 19 % в Европе и до 25 % в Азии) гомозиготны по *X*-аллелю полиморфизма R577X этого гена [631]. Вследствие замены в 16 экзоне возникает стоп-кодон, блокирующий процесс трансляции иРНК, что ведет к дефициту α -актина-3. Вследствие мутации α -актин-3 заменяется на α -актин-2, что приводит к снижению скоростно-силовых показателей физической работоспособности человека [813].

Низкая частота 577XX-генотипа среди спортсменов по сравнению с контролем указывает на то, что в процессе спортивного отбора произошло отсеивание спортсменов, чьи мышечные клетки не содержали этого миофибриллярного белка. Среди квалифицированных и высококвалифицированных спортсменов обнаружено достоверное снижение процента XX-генотипа в группе скоростно-силовых видов спорта и у спортсменок, занимающихся видами спорта, требующими выносливости. Таким образом, функционально активный α -актинин-3 (генотипы *R/X* и *R/R*) обеспечивает определенные преимущества для разных типов физической активности человека [94].

Ген *CNV* контролирует синтез белка, входящего в состав регуляторной субъединицы Ca^{2+} — модулинфосфатазы, являющейся одним из основных регуляторов концентрации ионов Ca^{2+} . В результате делеции 5 нуклеотидов (5D-аллель) отмечается снижение связывания кальцеинейрина с Ca^{2+} -модулинфосфатазой, вследствие чего происходит активация транскрипции генов, приводящих к развитию различных

форм гипертрофии левого желудочка сердца, что с физиологической точки зрения является адаптационным процессом при повышенных физических нагрузках.

Ген *AMPD1* локализован в локусе 1p13.1, контролирует синтез специфической скелетно-мышечной аденозинмонофосфатдеаминазы (АМФ-деаминаза М-изоформа), которая, повышая эффективность синтеза АТФ, играет ключевую роль в регуляции энергетических процессов в скелетной мускулатуре. Во время интенсивных физических упражнений содержание АТФ падает и накапливается АМФ. Реакция, катализируемая АМФ-деаминазой, смещает равновесие миокиназной реакции в сторону образования АТФ за счет АМФ. Таким образом обеспечивается ресинтез АТФ при мышечном утомлении. 95 % *AMPD-M* сконцентрировано в быстрых мышечных волокнах II типа (БВ).

Причиной недостатка АМФ-деаминазы является замена цитозина на тимин в 34 нуклеотиде кодирующей последовательности (С34Т), в результате чего глютаминовый кодон превращается в стоп-кодон. У гомозигот по С-аллелю активность АМФ-деаминазы составляет 1 % от активности фермента у нормальных Т/Т-гомозигот [630]. Установлено, что в 2 % всех биопсий скелетных мышц активность АМФ-деаминазы резко снижена или фермент вообще не определяется, то есть они являются гомозиготами Т/Т. Индивидуумы, имеющие пониженную активность фермента, испытывают слабость, быструю утомляемость или мышечные судороги даже после средней по интенсивности физической нагрузки. Нехватка АМФД — одна из наиболее распространенных причин метаболической и вызванной физическими упражнениями миопатии у человека [476]. Для выявления связи между полиморфизмом гена *AMPD1* и специализацией спортсменов были протестированы представители 15 олимпийских видов спорта [208]. Из 207 обследованных спортсменов 155 человек оказались гомозиготами С/С, 50 — гетерозиготами С/Т и только 2 человека имели мутантный генотип Т/Т. При этом все спортсмены, занимающиеся горными лыжами и фристайлом, имеют генотип С/С. Среди биатлонистов носителей генотипа С/С было 95 %, среди борцов вольного и греко-римского стиля — 85 и 88 % соответственно.

Ген *AR* (рецептор андрогена) локализован на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq11–12, относится к семейству ядерных рецепторов и является транскрипционным фактором, функция которого

заключается в регуляции генов многих тканей, в том числе и мышечной. В первом экзоне гена *AR* имеются (CAG)*n*-повторы, кодирующие полиглутаминовый участок. В среднем число CAG-повторов находится в пределах от 17 до 26, что определяет полиморфизм этого гена.

В одном из исследований изучалась ассоциация полиморфизма CAG-повторов гена *AR* с массой тела и уровнем тестостерона в сыворотке крови у 406 мужчин и 90 женщин.

По результатам генотипирования были выделены две группы. В первую вошли лица с числом CAG-повторов до 22, во вторую — 22 и более. Оказалось, что индивиды второй группы (с большим количеством CAG-повторов) имели в среднем более высокие показатели безжировой массы тела и уровня тестостерона. Такая закономерность была характерна только для мужчин. Аналогичная зависимость была подтверждена при исследовании гена *AR* и у российских спортсменов [219]. Эти результаты позволили отнести ген рецептора андрогена к потенциальным маркерам предрасположенности к наращиванию мышечной массы у мужчин, что важно для скоростно-силовых видов спорта и культуризма.

7.4.6. Комплексный анализ аллелей выносливости и скорости/силы у спортсменов

В настоящее время выделяют 5 генов, ассоциация которых с основными физическими качествами спортсмена (сила и выносливость) представляется наиболее вероятной. Это гены *ACE*, *PPARA*, *ACTN3*, *PGC1A*, *AMPD1*. Соответственно, каждый человек может иметь от 0 до 10 аллелей выносливости и скорости/силы. Возможны комбинации 10 аллелей выносливости — *II(ACE)*; *GG(PPARA)*; *RR(ACTN3)*; *Gly/Gly(PGC1A)*; *CC(AMPD1)* и 10 аллелей скорости/силы *DD(ACE)*, *CC(PPARA)*, *RR(ACTN3)*, *Gly/Gly(PGC1A)*, *CC(AMPD1)*. Гены (аллели) выносливости и силы/скорости частично перекрываются. Результаты подсчета аллелей силы/скорости в группе спринтеров и аллелей выносливости в группе стайеров приведены в таблицах 7.4.8 и 7.4.9 соответственно.

Обращает на себя внимание увеличение числа носителей с 6–10 аллелями скорости/силы среди спринтеров по сравнению с контрольной группой (см. табл. 7.4.8).

Однако достоверные различия с контролем были выявлены только в отношении аллелей выносливости у спортсменов-стайеров.

Таблица 7.4.8

Распределение носителей с разным числом аллелей скорости/силы у спринтеров и в контрольной группе [10]

Количество аллелей скорости/силы	Спринтеры (n = 58), %	Контрольная группа (n = 106), %
3	1,7	4,7
4	12,1	19,8
5	22,4	28,3
6	29,4	23,6
7	24,1	15,1
8	8,6	7,6
9	1,7	0,9

Таблица 7.4.9

Распределение носителей с разным числом аллелей выносливости у стайеров и в контрольной группе [10]

Количество аллелей скорости/силы	Стайеры (n = 102), %	Контрольная группа (n = 106), %
4	1,0	4,7
5	4,9	10,4
6	17,6	24,5
7	28,4	27,4
8	30,4	21,7
9	11,8	11,3
10	5,9*	0
*P < 0,05, достоверные различия по критерию Фишера		

Использованный комбинационный подход с отдельной регистрацией числа аллелей выносливости и силы/скорости проще, чем анализ генотипов, и позволяет использовать неограниченное число генов, ассоциированных с физической деятельностью человека. По состоянию на 2006 год таких генов уже идентифицировано более 150 [281]. Исследования последних лет в области молекулярной генетики физической активности подтвердили полезность комбинационного подхода для анализа генотипических особенностей физических способностей спортсменов различного пола, специализации и квалифи-

Таблица 7.4.10

Соотношение медленных и быстрых мышечных волокон в биоптатах *m. vastus lateralis* в зависимости от генотипов *ACE*, *AGTR2*, *PPARA* и *PPARD* (n = 55)

Ген	Генотип	% MB	P	% БВ	P
ACE	II	47,4	0,014*	56,6	0,014*
	ID	47,7		54,9	
	DD	56,9		45,8	
AGTR2	CC	54,2	0,003*	48,9	0,003*
	AA	45,2		57,7	
PPARA	GG	52,0	0,047*	51,6	0,22
	GC	48,7		54,0	
	CC	42,1		57,8	
PPARD	TT	49,4	0,053	53,9	0,034*
	TC	57,3		41,6	
	CC	66,2		42,7	
*p < 0,05, статистически значимые различия между носителями различных генотипов					

кации [10, 83, 84]. Генотипирование будущих спортсменов позволяет получить ориентировочную информацию о наследственных особенностях физической активности человека, его предрасположенности к тому или иному виду спорта. Предполагается, что такой фенотипический эффект определяется ассоциацией этих генов с содержанием «медленных» и «быстрых» мышечных волокон в мышцах.

Действительно, результаты биопсии скелетных мышц высококвалифицированных спортсменов свидетельствуют о врожденном преобладании MB у стайеров и БВ — у спринтеров/силовиков [726].

Корреляционный анализ, проведенный на 55 здоровых физически активных молодых людях, выявил взаимосвязь полиморфизма генов *ACE*, *AGTR2*, *PPARA* и *PPARD* с типом мышечных волокон. Относительное содержание MB у носителей *ACE* (*DD*), *AGTR2* (*CC*) и *PPARA* (*GG*) в широкой латеральной мышце (*m. vastus lateralis*) было достоверно выше, чем у гомозигот по противоположным аллелям этих же генов (*II*, *A/A*, *T/T* соответственно), которые, в свою очередь, обнаруживали ассоциацию с высоким содержанием БВ (табл. 7.4.10) [24].

В результате этих исследований были установлены аллели 13 генов, ассоциированных с высоким содержанием MB (*ACE* *D*,

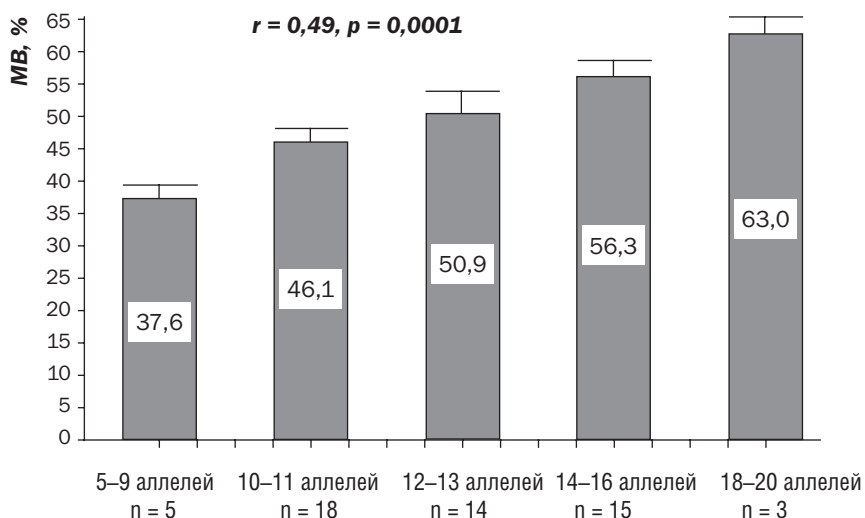


Рис. 7.4.1. Относительное содержание МВ в *m. vastus lateralis* у носителей различного числа аллелей предрасположенности к высокому содержанию МВ

ACTN3 X, ADRB2 48A, ADRB2 81C, AGT M, AGTR2 C, AMPD1 C, IGF1 >192>, PPARA G, PPARG Ala, PPARD C, PGC1A Gly, UCP2 Ala) и аллели 8 генов — с высоким содержанием БВ (*ACE I, ACTN3 R, AGT T, AGTR2 A, IGF1 192, PPARA C, PPARG Pro* и *PPARD T*). При суммировании аллелей предрасположенности к высокому содержанию МВ обнаружена прямая зависимость между числом таких аллелей и долей МВ (рис. 7.4.1).

Аналогичная зависимость была выявлена и в отношении БВ (рис. 7.4.2).

Таким образом, существует значимая корреляция между полиморфизмом генов *ACE, AGTR2, PPARA* и *PPARD* и типом мышечных волокон.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Приведенные наблюдения свидетельствуют о принципиальной возможности объективной оценки наследственных физических качеств человека, его перспективах и возможных осложнениях при занятиях тем или иным видом спорта. Рассмотрим на нескольких примерах практические рекомендации по результатам генетического тестирования.

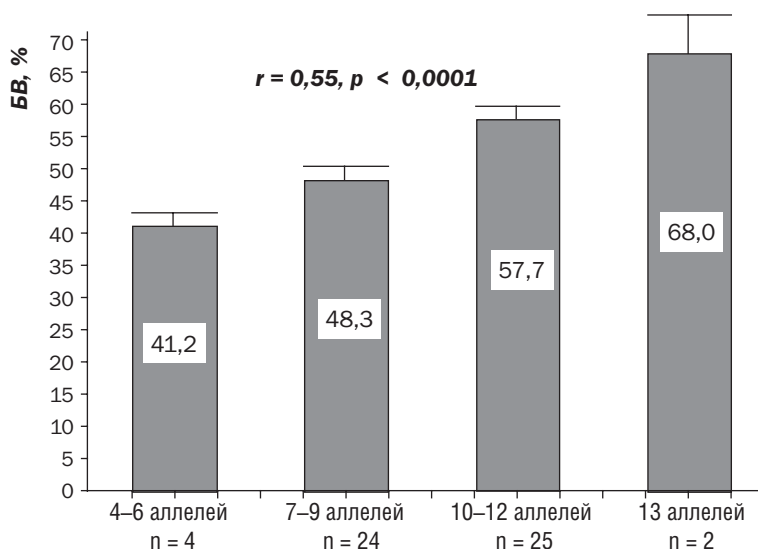


Рис. 7.4.2. Относительное содержание БВ в *m. vastus lateralis* у носителей различного числа аллелей предрасположенности к высокому содержанию БВ

Пример 1 (гены *ACTN3*, *AMPD1*, *CNB*)

Ген	Генотип
<i>ACTN3</i>	<i>C/T</i>
<i>AMPD1</i>	<i>C/C</i>
<i>CNB</i>	<i>I/I</i>

При генотипе *C/T* гена *ACTN3* в скелетных мышцах можно предполагать примерно равное распределение быстрых и медленных мышечных волокон. При генотипе *C/C* гена *AMPD1* энергетические процессы в мышечных волокнах протекают в полной мере и «переключение» на альтернативные пути синтеза АТФ происходит только в случае значительных перегрузок. При генотипе *I/I* гена *CNB* не происходит активации транскрипции генов, приводящих к врожденной гипертрофии левого желудочка сердца, вследствие чего нет ограничений в интенсивности и нагрузке при тренировке. Развитие гипертрофии возможно только при целенаправленных длительных тренировках и будет носить физиологически обусловленный приспособительный характер.

Рекомендации: с учетом генотипов по изученным генам тестированному рекомендуются усредненные нагрузки между силовыми трени-

ровками и тренировками на выносливость, без существенных ограничений по времени.

Пример 2 (гены *PPARG*, *PPARA*, *PPARD*)

Ген	Генотип
<i>PPARG</i>	<i>Pro/Pro</i>
<i>PPARA</i>	<i>G/G</i>
<i>PPARD</i>	<i>C/C</i>

При генотипе *Pro/Pro* по гену *PPARG* повышена чувствительность к инсулину в медленных и быстрых мышечных волокнах, но его анаболическое действие выражено слабо. При генотипе *G/G* по гену *PPARA* и *C/C* по гену *PPARD* в мышечных волокнах преобладает аэробный гликолиз, отмечается повышение утилизации жирных кислот в печени и мышечных волокнах.

Рекомендации: для достижения максимальных результатов в спорте данному субъекту рекомендованы тренировки на выносливость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спортивная генетика, как и вся предиктивная медицина, все еще находится в начале пути. Многочисленные экспериментальные данные и прямые наблюдения на добровольцах, в том числе и на спортсменах, позволили выявить не менее 150 генов-кандидатов физической активности человека, а также факторов, осложняющих или прогностически опасных для занятия спортом. Особенно значительные успехи достигнуты в идентификации генов, определяющих такие важные физические параметры, как выносливость и сила/скорость. Генеральное направление современной спортивной медицины — эффективный отбор молодых спортсменов, перспективных по своим наследственным качествам для занятия тем или иным видом спорта при одновременно минимальном риске «большого спорта» для здоровья спортсмена. Анализ полиморфизма генов помогает отличить индивидов, положительно реагирующих на дополнительные физические нагрузки, от лиц, для которых такие нагрузки могут быть нежелательными или вредными. Уже применяемый комплексный подход дает возможность наиболее полно оценивать вклад аллельных вариантов различных генов в физическую работоспособность человека. Он открывает путь к построению генных сетей физической активности выдающихся спортсменов. Поиск и дальнейшее внедрение ДНК-диагностики генетических маркеров

будет иметь не только научное, но и социально-экономическое значение, так как позволит повысить надежность и эффективность системы индивидуального отбора и подготовки высококвалифицированных спортсменов. Несомненно, в будущем будет найдено гораздо больше генов-кандидатов, ассоциированных с развитием и проявлением различных физических качеств, для каждого такого полиморфизма будет установлен реальный вклад в общее проявление какого-либо признака в зависимости от этноса, пола, возраста и характера физической деятельности. Уже на современном этапе реально создание генетического паспорта спортсмена, внедрение которого в жизнь способствует новому научному подходу к индивидуальному выбору вида спорта, более эффективному поиску будущих перспективных спортсменов, оптимизации схемы и режима тренировок.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных итогов расшифровки генома человека является быстрое развитие качественно нового раздела медицинской науки — **молекулярной медицины**, в рамках которой извечные проблемы диагностики, лечения и профилактики болезней решаются на уровне генов и продуктов их экспрессии — ДНК, РНК, белков. Идентификация тысяч новых генов, выяснение генной природы и молекулярных механизмов многих наследственных и мультифакториальных болезней, роли генетических факторов в этиологии и патогенезе различных патологических состояний, доказательство генетической уникальности каждого индивида составляют научную основу молекулярной медицины и определяют ее две характерные особенности. **Индивидуальный подход к больному** (профилактика, лечение и диагностика любого заболевания) основывается на генетических особенностях каждого субъекта, его генетической уникальности (1). Молекулярная медицина имеет **предсказательную (предиктивную) направленность**: профилактику и даже лечение можно начинать заранее, до появления реальной картины патологического процесса, то есть еще в досимптоматический период заболевания (2) [30–32].

Концептуальную основу предиктивной медицины составляют представления о генетическом полиморфизме, рассмотренные в главе 1. Напомним, что **генетический полиморфизм** обычно определяют как **менделевский признак, встречающийся в популяции, по крайней мере, в 2 вариантах с частотой не менее 1 %** [209].

8.1. КАЖДЫЙ ЧЕЛОВЕК ГЕНЕТИЧЕСКИ УНИКАЛЕН

Благодаря генетическому полиморфизму каждый человек имеет свой уникальный геном и, соответственно, обладает уникальными биохимическими свойствами (**биохимический фингерпринт**). Уже первое сравнительное изучение геномов у представителей разных рас и этнических групп показало не только глубокое генетическое родство всех людей (сходство геномов — 99,9%), но и позволило получить ценную информацию о происхождении человека, маршрутах его расселения по планете, путях этногенеза и пр. (см. главу 1).

Эти исследования позволили установить, что все люди, населяющие сегодня нашу планету, действительно являются генетическими братьями и сестрами. Более того, межиндивидуальная вариабельность даже при секвенировании генов представителей разных рас не превысила 0,1% и была обусловлена, главным образом, **однонуклеотидными заменами — SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)**. Такие замены весьма многочисленны и встречаются через каждые 250–400 п. о. Их общее число в геноме оценивается величиной в 10–13 миллионов. Предполагается, что около половины всех SNP (5 млн) приходится на смысловую (экспрессирующуюся) часть генома. Именно они особенно важны для молекулярной диагностики наследственных болезней. Им принадлежит основная роль и в генетическом полиморфизме человека [30, 86, 170, 171, 173].

Поскольку генетический полиморфизм напрямую ассоциирован с функциональным состоянием гена, изучение медицинских аспектов генетического полиморфизма составляет концептуальную и методическую основу **предиктивной (предсказательной) медицины** (см. 1.2.5).

Генетический полиморфизм — это мутации, которые напрямую не связаны с наследственными заболеваниями, но могут существенно влиять на предрасположенность человека к той или иной мультифакториальной патологии. Объясняется это тем, что генетический полиморфизм далеко не всегда нейтрален и может приводить к появлению белковых продуктов с измененной функциональной активностью (см. раздел 3.3).

Еще раз напомним, что, согласно нашему определению, **гены предрасположенности — это мутантные гены (аллели), которые совместимы с рождением и жизнью, но при определенных неблагоприятных условиях способствуют развитию того или иного заболевания** (см. раздел 3.3).

В зависимости от участия в метаболических цепях и ассоциации с мультифакторными заболеваниями гены предрасположенности условно подразделяют на несколько групп, среди которых выделяют гены «внешней среды», гены «метаболические шунты» (гены-триггеры), гены клеточных рецепторов, гены воспаления и иммунной защиты, гены, ассоциированные с мультифакториальными заболеваниями [30–32]. Неблагоприятные аллельные варианты этих генов могут быть причиной таких мультифакториальных заболеваний, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, остеопороз, диабет, бронхиальная астма, опухоли и пр. Сочетания аллельных вариантов различных генов, обеспечивающих нормальный метаболический процесс или вовлеченных в развитие конкретной мультифакториальной патологии, получили название **генных сетей** [77] (см. раздел 3.1). В каждой из таких сетей выделяют главные (центральные) гены и дополнительные (вспомогательные) гены, так называемые гены-модификаторы.

Выяснение генной сети каждого мультифакториального заболевания, идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, анализ ассоциации их аллелей с заболеванием, разработка на этой основе комплекса профилактических мероприятий для конкретного пациента составляют концептуальную и методическую основу предиктивной (предсказательной) медицины [30].

В настоящее время, как показывает анализ мировой литературы, в клинической практике уже применяются свыше 1 000 генетических тестов. Разработаны панели таких тестов не только для моногенных, но и для многих наиболее частых МФЗ. Идентификация всех генов человека, открытие новых генных сетей, разработка принципиально новых вариантов эффективной идентификации генов-кандидатов методом общегеномного сканирования однонуклеотидных замен (техника *НарМар*) [766] стремительно увеличивают возможности генетического тестирования наследственной предрасположенности, повышают информационную и практическую значимость медико-генетического консультирования.

8.2. БОЛЕЗНИ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, ДОСТУПНЫЕ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Генетическое тестирование наследственной предрасположенности уже достаточно широко практикуется во многих частных лабораториях

и диагностических центрах Западной Европы и Америки. Генетическое тестирование с целью выявления наследственной предрасположенности к различным мультифакториальным болезням в России только начинается и сосредоточено в лабораториях Санкт-Петербурга, Москвы, Уфы, Томска и Новосибирска. Список болезней с наследственной предрасположенностью, соответствующих им генных сетей и аллельных вариантов отдельных генов, анализ которых уже в течение ряда лет проводится в Санкт-Петербурге, приведен в таблице 8.1 [34, 84].

В общей сложности он включает в себя более 25 болезней, в том числе и такие распространенные, как ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, рак молочной железы, легкого, предстательной железы, наркомания, бронхиальная астма, остеопороз и некоторые другие (табл. 8.1).

При этом, однако, следует иметь в виду, что данные разных лабораторий в отношении идентификации генов-маркеров, ассоциированных с одними и теми же заболеваниями, далеко не всегда совпадают (см. разделы 6.1 (бронхиальная астма) или 6.3 (диабет)). В литературе постоянно появляются данные о все новых генах-маркерах, ассоциированных с той или иной болезнью или патологическим фенотипом. Следовательно, генетический паспорт реально представляет собой динамичную систему с постоянно уточняющимися и усложняющимися параметрами составляющих его генов-маркеров, ассоциированных с разными заболеваниями.

Вместе с тем важно подчеркнуть, что для оценки прогностической ценности особую значимость представляют результаты исследования генных ассоциаций именно в той популяции и в том регионе, где предполагается проводить генетическое тестирование. В частности, генетическое тестирование в Санкт-Петербурге проводится только для тех болезней, для которых в предварительных исследованиях на больных Северо-Западного региона уже была доказана неслучайная ассоциация определенного аллеля с соответствующей болезнью и были проведены подсчеты эмпирического риска развития заболевания. При этом наличие такого аллеля еще не позволяет судить ни о времени начала заболевания, ни о его тяжести. Нельзя также утверждать, что обследуемый наверняка заболеет именно этой болезнью. **Генетическое тестирование в досимптоматический период дает возможность выявить существующие пока только в геноме наследственные тенденции к развитию будущих болезней и, исходя из современного врачебного опыта, наметить пути их мониторинга и ранней профилактики.**

Таблица 8.1

Генетический полиморфизм, ассоциированный с некоторыми заболеваниями внутренних органов и систем (тестирование которого проводится в лаборатории пренатальной диагностики НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН)

Белок — ген (полиморфизм)	Заболевания
<ul style="list-style-type: none"> Аполипопротеин Е — <i>APOE</i> (Cys112Arg, Arg158Cys) Параоксоназа <i>PON-3</i> (Gln192Arg) Аполипопротеин С III <i>APO CIII</i> (C/G, позиция 5163) Аполипопротеин А <i>APOAIV</i> (C/T, позиция +93) Ингибитор активатора плазминогена 1 — <i>PAI1</i> (4G/5G промотор, позиция –675) Ангиотензинконвертирующий фермент — <i>ACE</i> (I/D, интрон 16) V фактор свертывания крови — <i>F5</i> (Arg506Gln) VII фактор свертывания крови — <i>F7</i> (Arg353Glu; I/D промотор, позиция –323) Метилентетрагидрофолатредуктаза — <i>MTHFR</i> (C/T, позиция 677) Метаболизм липопroteinов — <i>CETP</i> (1405V) 	Ишемическая болезнь сердца
<ul style="list-style-type: none"> Ангиотензинконвертирующий фермент — <i>ACE</i> (I/D, интрон 16) Ангиотензиноген — <i>AGT</i> (Met235Thr) Рецептор 1-го типа к ангиотензину II — <i>AGTR1</i> (1166A>C) Рецептор 2-го типа к ангиотензиногену II — <i>AGTR2</i> (48 A>C; 81 C>G) Ренин — <i>REN</i> 	Эссенциальная гипертензия
<ul style="list-style-type: none"> Аполипопротеин Е — <i>APOE</i> (Cys112Arg, Arg158Cys) 	Болезнь Альцгеймера
<ul style="list-style-type: none"> Семейство генов главного комплекса гистосовместимости — <i>HLA-DR</i> и <i>HLA-DQ</i>, (аллели <i>DR3</i> и <i>DR4</i>) Антиген главного комплекса гистосовместимости I класса — <i>MICA</i> (5-копийный повтор 3 нуклеотидов в экзоне 5) Рецептор витамина D — <i>VDR</i> (FokI, ApaI, TaqI полиморфизм — <i>f</i>-, <i>a</i>-, <i>t</i>-аллели) 	Сахарный диабет 1-го типа
<ul style="list-style-type: none"> Ангиотензинконвертирующий фермент — <i>ACE</i> (I/D интрон 16) Эндотелиальная NO-синтаза — <i>NOS3</i> (4 и 5 копийные повторы 27 нуклеотидов в интроне 4) 	Диабетическая нефропатия при диабете 1-го типа
<ul style="list-style-type: none"> Ангиотензинконвертирующий фермент — <i>ACE</i> (I/D, интрон 16) Ингибитор активатора плазминогена 1 — <i>PAI1</i> (4G/5G промотор, позиция — 675) 	Сахарный диабет 2-го типа

Таблица 8.1 (продолжение)

Белок — ген (полиморфизм)	Заболевания
<ul style="list-style-type: none"> Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) Глютатион-S-трансфераза T1 — <i>GSTT1</i> (0/0) Глютатион-S-трансфераза P — <i>GSTP1</i> (аллель B) Онкоген — <i>MYCL1</i> (L/S, интрон 2) Цитохром P450 17 A1 — <i>CYP17A1</i> (Msp A1–/Msp A1+) Ароматаза (цитохром P450 19) — <i>CYP19A1</i> (TTTA, интрон 5) p53–6 — <i>TP53</i> (Msp1+/Msp 1–, интрон 6) p53–16 — <i>TP53</i> (119/135, интрон 3) p53–72 — <i>TP53</i> (Bst U1+/Bst U1–, экзон 4) 	Рак молочной железы
<ul style="list-style-type: none"> Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) Глютатион-S-трансфераза T1 — <i>GSTT1</i> (0/0) Ариламин-N-ацетилтрансфераза 2 — <i>NAT2</i> (S/S медленная форма) Цитохром P450 1A1 — <i>CYP1A1</i> (экзон 7, A–G, Ile –Val) p53–6 — <i>TP53</i> (Msp1+/Msp 1–, интрон 6) p53–16 — <i>TP53</i> (119/135, интрон 3) p53–72 — <i>TP53</i> (Bst U1+/Bst U1–, экзон 4) Онкоген — <i>MYCL1</i> (L/S, интрон 2) 	Рак легких
<ul style="list-style-type: none"> Вирус папилломы человека — HPV p53–6 — <i>TP53</i> (Msp1+/Msp 1–, интрон 6) p53–16 — <i>TP53</i> (119/135, интрон 3) p53–72 — <i>TP53</i> (Bst U1+/Bst U1–, экзон 4) 	Рак шейки матки
<ul style="list-style-type: none"> Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) Глютатион-S-трансфераза T1 — <i>GSTT1</i> (0/0) Ариламин-N-ацетилтрансфераза 2 — <i>NAT2</i> (S/S медленная форма) 	Рак толстого кишечника
<ul style="list-style-type: none"> Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) Глютатион-S-трансфераза T1 — <i>GSTT1</i> (0/0) 	Рак мочевого пузыря
<ul style="list-style-type: none"> Андрогенный рецептор — <i>AR</i> p53–6 — <i>TP53</i> (Msp1+/Msp 1–, интрон 6) p53–16 — <i>TP53</i> (119/135, интрон 3) p53–72 — <i>TP53</i> (Bst U1+/Bst U1–, экзон 4) 	Рак предстательной железы
	Доброкачественная гиперплазия предстательной железы
<ul style="list-style-type: none"> Онкоген — <i>MYCL1</i> (L/S, интрон 2) p53–6 — <i>TP53</i> (Msp1+/Msp 1–, интрон 6) p53–16 — <i>TP53</i> (119/135, интрон 3) p53–72 — <i>TP53</i> (Bst U1+/Bst U1–, экзон 4) 	Неблагоприятный прогноз течения некоторых онкологических заболеваний

Таблица 8.1 (окончание)

Белок — ген (полиморфизм)	Заболевания
<ul style="list-style-type: none"> • Рецептор дофамина — <i>DRD-2A</i> (Ta_q 1+/Ta_q 1–) • Рецептор дофамина — <i>DRD-2B</i> (Ta_q 1+/Ta_q 1–) 	Предрасположенность к патологическим пристрастиям: табакокурению, алкоголизму, наркомании
<ul style="list-style-type: none"> • Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) • Глютатион-S-трансфераза T1 — <i>GSTT1</i> (0/0) • Интерлейкин-4 — <i>IL4</i> (C590T) • Интерлейкин-4R — <i>IL4R</i> (Q576R) • Фактор некроза опухоли альфа — <i>TNFA</i> (G-308A) 	Бронхиальная астма
<ul style="list-style-type: none"> • Метилентетрагидрофолатредуктаза — <i>MTHFR</i> (C-T, позиция 677) • Метионинсинтеазредуктаза — <i>MTRR</i> (A-G, позиция 66) 	Дефект зарощения нервной трубки плода
<ul style="list-style-type: none"> • Фактор V свертывания крови — <i>F5</i> (G-A позиция 1691, Arg506Gln) • Ингибитор активатора плазминогена 1 — <i>PAI1</i> (4G/5G промотор, позиция –675) • Тканевый активатор плазминогена — <i>PLAT</i> • VII фактор свертывания крови — <i>F7</i> (Arg353Glu; I/D промотор, позиция –323) • Рецепторный гликопротеин IIIa (GPIIIa) — <i>ITGB3</i> (A1/A2) • Метилентетрагидрофолатредуктаза — <i>MTHFR</i> (C677T) • Протромбин, фактор II свертывания крови — <i>F2</i> (G20210A) 	Наследственная тромбофилия
<ul style="list-style-type: none"> • Микросомальная эпоксидгидролаза — <i>EPHX1</i> (Y113H замена T-C экзон 3) 	Хроническая обструкционная пневмония, эмфизема легких
<ul style="list-style-type: none"> • Рецептор витамина D — <i>VDR</i> (T-C экзон 9, Ta_qI сайт) • Коллаген I типа α1 — <i>COL1A1</i> (G-T позиция 1377, Sp1 сайт) • Рецептор кальцитонина — <i>CALCR</i> (T-C позиция 447, Alu I сайт) 	Остеопороз
<ul style="list-style-type: none"> • Трансмембранный белковый рецептор — <i>CCR5</i> (del 32) 	Устойчивость к ВИЧ-инфекции
<ul style="list-style-type: none"> • Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) • Ариламин-N-ацетилтрансфераза 2 — <i>NAT2</i> (S/S медленная форма) 	Эндометриоз
<ul style="list-style-type: none"> • Глютатион-S-трансфераза M1 — <i>GSTM1</i> (0/0) • Глютатион-S-трансфераза T1 — <i>GSTT1</i> (0/0) • Глютатион-S-трансфераза P — <i>GSTP1</i> 	Привычное невынашивание

В результате обследования может быть получена информация о той или иной степени риска развития указанных заболеваний, и врач, принимая во внимание результаты молекулярно-генетического анализа, может разработать тактику патогенетически обоснованной упреждающей терапии, то есть внести необходимую коррекцию с целью коррекции врожденного метаболического дефекта.

Так, назначение ингибиторов ангиотензинконвертирующего фермента (АКФ) и антагонистов рецепторов к ангиотензину II у пациентов с выявленным *DD*-генотипом *ACE* (angiotensin converting enzyme), артериальной гипертензией и начальными признаками поражения органов-мишеней обусловлено способностью этих препаратов противодействовать пролиферативным и прессорным эффектам ангиотензина II не только в клетках сосудистой стенки, но и в кардиомиоцитах. Данный подход следует рассматривать как наиболее адекватную медикаментозную профилактику дисфункции и гипертрофии левого желудочка, гипертонической болезни, ИБС и застойной сердечной недостаточности у лиц с *DD*-генотипом *ACE*. Например, уже сейчас возможно прогнозировать развитие ишемической болезни сердца в результате выявления генетической предрасположенности к дислипидемии с развитием атеросклероза сосудов, к нарушению свертывающей системы крови и процесса фибринолиза, к дисфункции эндотелия и ремоделированию сосудистой стенки, гипертрофии и ремоделированию миокарда левого желудочка. В ряде случаев у пациента ожидается высокий риск развития инфаркта миокарда еще до 40–50 лет, причем вероятность развития данной формы ИБС при определенных аллельных вариантах исследуемых генов резко возрастает в случае чрезмерной физической нагрузки. Генетически детерминированные венозные тромбоэмболии нередко становятся осложнениями хирургических вмешательств, переломов, приема контрацептивных препаратов и т. п.

Развитие гипертонической болезни прогнозируется с учетом возможного повышения тонуса резистивных сосудов вследствие усиления образования ангиотензина II, обусловленного генетически детерминированным возрастанием синтеза ангиотензиногена и увеличением активности АКФ.

Известна высокая частота аллеля *E4* гена аполипопротеина E у лиц, страдающих болезнью Альцгеймера. Наличие определенных аллельных вариантов указанного гена может свидетельствовать о повышенном или высоком риске развития болезни Альцгеймера. Тестирование генов 1-й и 2-й фаз детоксикации позволяет идентифицировать

индивидов с предрасположенностью к заболеваниям, провоцируемым неблагоприятными экзогенными факторами. Следует отметить, что выявление лиц группы высокого риска до появления признаков заболевания имеет принципиальное значение для правильного медико-генетического консультирования с последующим проведением своевременной и адекватной упреждающей терапии.

Установлено, что для курильщиков, имеющих делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* и, как следствие, отсутствие этих ферментов, риск заболеть раком легких примерно в 3 раза выше по сравнению с курильщиками с нормальной функцией этих ферментов. Еще выше (почти в 20 раз) риск рака молочной железы у курящих женщин с дефицитом *GSTM1* и медленной формой N-ацетилтрансферазы (*NAT2*).

Исследование онкогена *MYCL1* показало взаимосвязь его полиморфизма с развитием пролиферативных процессов в основном в легких и молочных железах, а также с быстрым вовлечением в процесс метастазирования лимфатических узлов.

Продуктом гена *CYP19A1* является ароматаза. Ферментный комплекс ароматазы отвечает за превращение андрогенов C19 в эстрогены. Изменение активности гена *CYP19A1* является важным механизмом аутокринной регуляции роста опухоли. Исследование аллельного полиморфизма генов *CYP17A1* и *CYP19A1* позволяет прогнозировать риск развития опухолей преимущественно в молочных железах. Изучение аллельного полиморфизма гена *p53* позволяет судить о полноценности его супрессорной функции в случае развития пролиферативных процессов в организме. Распределение аллелей гена аденорецептора коррелирует с активностью соответствующего рецептора, а повышенная андрогенная стимуляция является одной из причин развития рака предстательной железы и характеризуется быстрым метастазированием первичной опухоли.

Комплексное тестирование генов метаболизма (внешней среды) и генов рецепторов, в том числе и генов метаболизма лекарств, позволяет не только идентифицировать индивидов с «быстрым» и «медленным» типами метаболизма ксенобиотиков, но и определять индивидуальную чувствительность к различным фармакологическим препаратам. Именно таким образом можно подобрать индивидуальную дозировку различных лекарств и приблизиться к идеальной схеме индивидуального лечения, то есть к решению основной задачи фармакогенетики [126] (см. раздел 7.2).

Тестирование генов — метаболических шунтов, продукты которых играют ключевую роль в метаболических процессах, имеет важное значение для оценки индивидуальной предрасположенности к различным мультифакториальным болезням. Изучение полиморфизма таких генов позволяет анализировать особенности индивидуальной предрасположенности к остеопорозу, эндометриозу, ВИЧ-инфекции, ко многим онкологическим заболеваниям. Аллельный полиморфизм многих других генных локусов обнаруживает несомненную ассоциацию с диабетом, атеросклерозом, гипертонической болезнью, ИБС, психическими заболеваниями.

В настоящее время уже на основе имеющихся данных вполне оправданно тестирование многих генов-маркеров, ассоциацию которых с тяжелыми заболеваниями можно считать доказанной.

Наш собственный опыт и анализ состояния проблемы в мире убеждают в том, что уже сегодня возможности предиктивной медицины весьма значительны.

Индивидуальный подход к пациенту, основанный на адекватной интерпретации результатов генетического исследования и их сопоставлении с данными клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования, позволяет осуществить раннюю диагностику генетически детерминированных заболеваний и предложить максимально эффективную схему профилактических и лечебных мероприятий для предупреждения развития патологического процесса.

Уже сегодня молекулярные исследования активно входят в медицинскую практику. Каждый человек может получить достаточно полную информацию об уникальных особенностях своего генома, в том числе и о состоянии генов предрасположенности.

Важно отметить, что все вышесказанное относится к так называемым прогностическим генным маркерам, на основании которых нельзя поставить однозначный диагноз, как это делается в случае моногенной патологии. Согласно современным представлениям, следует дифференцировать «генетический тест — ГТ» (**genetic test**) и «генетический (молекулярный) анализ — ГА» (**genetic assay**) [817, 818]. Первое понятие относится к диагностическим маркерам, которых для мультифакториальных болезней пока известно сравнительно немного, например, *APOE* аллель *E4* (нейродегенеративные заболевания), Лейденовская мутация фактора V (тромбофилия), *MTHFR 677T*

(гипергомоцистеинемия) и некоторые другие. Ассоциация функционально неблагоприятных аллелей этих генов с нарушениями соответствующих метаболических цепей и даже с определенными патологическими состояниями хорошо отражена в публикациях из разных лабораторий, на разных популяциях, в том числе и данными мета-анализа обобщенных результатов оригинальных исследований. Однако и эти ГТ в настоящее время только находятся на стадии клинических испытаний [817].

В отличие от ГТ, **результаты ГА имеют прогностический характер и требуют дальнейших подтверждений, в условиях как ретроспективных, так и проспективных исследований, прежде чем обретут статус генетического теста.** Полученные на достаточно большой выборке пациентов, подкрепленные убедительной по численности группой контроля молекулярные анализы полиморфизма отдельных генов даже в условиях одной популяции или населения одного региона приближаются к критериям, предъявляемым к генетическому тесту. Условия, необходимые для сертификации ГА в качестве ГТ, в настоящее время разрабатываются Европейской комиссией по генетике человека [347]. Согласно последним разработкам Службы генетического тестирования Великобритании (United Kingdom Genetic Testingnetwork), качество ГТ оценивается исходя из следующих четырех правил: аналитическая пригодность (1), клиническая достоверность (2), клиническая полезность (3), этическое, социальное и юридическое соответствие (4) [817].

Современное состояние проблемы генетического тестирования и интерпретации полученных результатов, этические и правовые аспекты будут рассмотрены в конце данной главы, а также в главах 9, 10 и в Заключении.

8.3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА (ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ)

В настоящее время во многих диагностических центрах России широко применяются молекулярные методы с целью диагностики генных болезней, выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций в семьях высокого риска, для досимптоматической диагностики болезней с поздней манифестацией и с целью идентификации личности (геномная дактилоскопия). Постепенно набирает силу генетическое тестирование в рамках предиктивной медицины. Очевидно, что в результате этих исследо-

ваний происходит накопление данных как о геноме отдельных индивидов, так и о целых семьях, то есть постепенно формируются индивидуальные и семейные базы ДНК-данных. Эта база ДНК-данных и является «генетическим паспортом».

Таким образом, генетический паспорт представляет собой индивидуальную базу ДНК-данных, отражающую уникальные генетические особенности каждого человека, его предрасположенность к тем или иным наследственным, мультифакториальным и другим заболеваниям [29, 30, 39].

Информация, содержащаяся в этом поистине уникальном документе, должна помочь избежать жизненных коллизий, связанных с игнорированием индивидуальных особенностей генома, то есть специфических характеристик наследственности. Такие данные позволяют полнее реализовать свои генетические способности и представляют несомненную ценность для потомков.

Повсеместное внедрение в современную медицину методов молекулярной диагностики уже сделало реальной идею создания генетического паспорта. Он уже существует *de facto*, и число генетических тестов, составляющих его основу, быстро увеличивается. Вместе с тем приступить к формированию и, особенно, практическому использованию генетического паспорта можно только при соблюдении достаточно строгих требований. Последние включают в себя:

- 1) подробно изученную генную сеть каждого мультифакториального заболевания;
- 2) достоверные клинические и популяционные данные, подтверждающие вклад соответствующих генов-маркеров в патогенез мультифакториального заболевания;
- 3) наличие репрезентативных данных для популяции своего региона или у больных соответствующей этнической группы, подтверждающих ассоциацию тестируемых генов-маркеров с заболеванием;
- 4) взвешенную интерпретацию результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности;
- 5) рекомендации по результатам генетического тестирования (даным генетического паспорта);
- 6) мониторинг отдаленных результатов состояния здоровья пациента после генетического тестирования;
- 7) конфиденциальность, доступность, юридическая и правовая защищенность.

Еще в своем первоначальном варианте [433] индивидуальная генетическая карта (генетический паспорт) предполагала следующие основные разделы:

- собственно паспортные данные (Ф И О, год рождения, национальность);
- кариотип пациента;
- собственный идентификационный генетический номер, полученный методом геномной дактилоскопии и представляющий собой число из 12 цифр;
- результаты тестирования на бессимптомное носительство мутаций наиболее частых моногенных болезней (см. ниже);
- досимптоматическую диагностику болезней с поздней манифестацией (см. ниже);
- результаты тестирования генов-маркеров частых мультифакториальных болезней;
- медико-генетическое заключение по результатам генетического консультирования до и после генетического тестирования;
- рекомендации по результатам генетического тестирования для консультируемого и для лечащего врача.

Генетическая карта в полном варианте должна включать в себя результаты исследования не только генов предрасположенности, но и бессимптомного носительства мутаций генов наиболее частых наследственных болезней (гемофилии, муковисцидоза, фенилкетонурии и др.). В настоящее время диагностические возможности существующих молекулярных лабораторий России, в том числе и Санкт-Петербурга, позволяют обеспечить достаточно полный набор необходимых генетических анализов. Один из первых вариантов «генетического паспорта», впервые предложенный еще в 1997 г. и уже более 10 лет разрабатываемый в НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН, приведен на рисунке 8.1.

В настоящее время практическое применение находят только некоторые составляющие генетического паспорта (тестирование гетерозиготного носительства, геномная дактилоскопия, кариотипирование). Реже и только в семьях высокого риска проводится тестирование наследственной предрасположенности к бронхиальной астме, диабету или остеопорозу. Нетрудно предвидеть, что в обозримом будущем такой генетический паспорт найдет широкое применение в клинической практике, а многие генетические анализы и диагностические тесты станут

Год рождения
Идентификационный номер
Национальность

Кариотип

Досимптоматическая диагностика

1. Нейродегенеративные заболевания:
HD; SCA1; DRPLA; AR; SCA2; MP1
2. Семейный рак молочной железы:
BRCA1; BRCA2
3. Семейный аденоматозный полипоз (FAP): APC
4. Болезнь Альцгеймера:
PS1; PS2
5. Прочие

Диагностика гетерозиготного носительства

Муковисцидоз;
Миодистрофия Дюшенна;
Гемофилия А;
Фенилкетонурия;
Адреногенитальный синдром;
Спинальная мышечная атрофия.

Геномная дактилоскопия

VWF 5; APOB; AR9; HPRT;
STRX1; HLA

МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ВРАЧА И ПАЦИЕНТА ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Тестирование наследственной предрасположенности

Бронхиальная астма: GSTM1; GSTT1
Эндометриоз: GSTM1; NAT2
Остеопороз: VDR; COL1A1; CALCR
Хронический обструктивный бронхит: EPHX1; CFTF
Рак легкого: GSTM1; GSTT1; NAT2;
CYP1A1; p53-6; p53-16; p-53-72;
Рак простаты: AR; p53-6; p53-16; p-53-72;
Рак молочной железы: GSTM1; GSTT1;
GSTP1; MYCL1; NAT2; CYP1A1;
CYP17; CYP19; p53-6; p53-16; p-53-72
Рак толстой кишки: GSTM1; GSTT1; NAT2
Диабет I: HLA DR и DQ (DR3 и DR4)
MICA; VDR
Ишемическая болезнь сердца: APOE;
MTHFR; APOC; PON; FV; FVII; ACE
Гипертоническая болезнь: AGT; PAI1; ACE; ANT
Парадонтоз: IL1A (4845+); IL1B (3954)
Алкоголизм: DRD3; DAT1
Наркомания: DRD2A; DRD2
Наследственная тромбофилия: F5
Устойчивость к ВИЧ-инфекции: CCR5 (32del+)

Рис. 8.1. Вариант «генетического паспорта» [29, 30]

столь же рутинным делом, как и стандартные лабораторные исследования (анализ крови, мочи, определение группы крови и резус-фактора, тесты на инфекционные болезни и пр.). Приведенный на рисунке 8.1. вариант генетического паспорта соответствует нашим знаниям о генных маркерах, о некоторых частых мультифакториальных болезнях до 2000 года. К 2007 году число нозологий и соответствующих им генов-маркеров, изученных в нашей и других лабораториях и центрах РФ, существенно возросло. Более полную информацию о генах-маркерах, ассоциированных с различными болезнями, можно найти в соответствующих разделах глав 5 и 6.

В настоящее время в нашей лаборатории проводится определение около 100 генов-маркеров, ассоциированных с различной мультифакториальной патологией (см. главу 5). При этом, как показывает наш опыт, практически востребованным является тестирование наследственной предрасположенности по какой-то одной или нескольким нозологиям, в отношении которых, согласно результатам предварительного медико-генетического консультирования, у пациента имеется реальный риск.

Более продвинутой на пути клинического внедрения является **генетическая карта репродуктивного здоровья**, которая представляет собой итог многолетних комплексных исследований репродуктивной функции женщин, проводимых в НИИ акушерства и гинекологии

Год рождения Национальность	(1) Медико-генетическое консультирование супружеской пары	(5) Тестирование наследственной предрасположенности: Тромбофилия: <i>F5; MTHFR; PAI1; PLAT; ITGB3; PR; FB</i> (7) Гестозы: <i>GSTP1; PAI1; TNFA; NOS3; ACE; PON; ITGB3; HLA-G; GSTM1; EPHX1</i> (10) Привычное невынашивание: <i>GSTM1; GSTT1; GSTP1; DRB1; DQA1; DQB1; MTHFR</i> (7) Диабет 1-го типа: <i>HLA DR и DQ (DR3 и DR4); MICA; VDR; CTLA4</i> (6) Диабет 2-го типа: <i>DQB1; ACE; TNFA; PRARA; PRARD; TCF7L2</i> (6) Эндометриоз: <i>GSTT1; GSTM1; CYP19 EPHX1; NAT2; TNFA; IL4R; CYP1A1</i> (8) Остеопороз: <i>VDR; COL1A1; CALCR; ER1</i> (4) Бронхиальная астма: <i>GSTT1; GSTM1; TNFA; IL4; IL4R; NOS1</i> (8) Нерасхождение хромосом в мейозе и дефекты зародка нервной трубки: <i>MTHFR; MTTR</i> (2)
(2) Кариотип	(4) СВЕДЕНИЯ О СУПРУГЕ: 1. Кариотип (2). 2. Тесты на гетерозиготное носительство мутаций наиболее частых моногенных болезней (3).	
(3) Диагностика гетерозиготного носительства: <ul style="list-style-type: none"> • Муковисцидоз; • Миодистрофия Дюшенна; • Гемофилия А; • Фенилкетонурия • Аденогенитальный синдром; • Спинальная мышечная атрофия. 		

**КОНСУЛЬТАЦИИ ГЕНЕТИКА и АКУШЕРА;
ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ВРАЧА И БЕРЕМЕННОЙ
ВЫРАБОТКА ТАКТИКИ ВЕДЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Рис. 8.2. Вариант генетической карты репродуктивного здоровья [33]

им. Д. О. Отта СЗО РАМН (Санкт-Петербург). Карта рекомендована к применению в Центре планирования семьи, а также в родовом и других отделениях института. Она широко используется на консультативных амбулаторных приемах врачами-генетиками и врачами акушерами-гинекологами нашего института. Помимо анализа кариотипа и тестирования на носительство мутаций тяжелых наследственных заболеваний у супругов, планирующих ребенка, важное прогностическое значение имеет исследование женщины по генным панелям заболеваний, осложняющих беременность, развитие плода, роды и послеродовый период (гестозы, привычное невынашивание, варикозная болезнь, фетоплацентарная недостаточность) (рис. 8.2). Для гинекологов и эндокринологов большой интерес представляет тестирование наследственной предрасположенности к эндометриозу, аденомиозу и постменопаузальному остеопорозу.

Особое внимание обращено на тестирование наследственных форм тромбофилии, для диагностики которой был разработан специальный микробиочип «Фиброчип» [97]. Так же как в случае генетического паспорта, проводимые в НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН клинические испытания генетической карты репродуктивного здоровья (ГКРЗ) сосредоточены преимущественно на отдельных нозологиях, таких как эндометриоз (прогноз заболевания и выбор оптимальной тактики лечения), наследственные тромбофилии, факторы невынашивания беременности

и плацентарной недостаточности, гестоз (прогноз и профилактика). Накапливаемая в ходе проспективного тестирования информация о генетических маркерах акушерской патологии является основанием для более широкого внедрения ГКРЗ в клиническую практику. Генетической карте репродуктивного здоровья нами посвящены специальные методические рекомендации, опубликованные в 2009 г. Важным разделом этих рекомендаций является оценка результатов генетического тестирования и их возможная интерпретация («Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. Генетическая карта репродуктивного здоровья: методические рекомендации»). Под редакцией В. С. Баранова и Э. К. Айламазяна, 2009, 68 с.).

Согласно рекомендациям ВОЗ, генетическое тестирование должно проводиться с учетом добровольного, сознательного согласия тестируемого, то есть по достижении им совершеннолетия. Формально это означает, что важная генетическая информация может стать доступной сравнительно поздно, когда ее польза для обследуемого и его близких родственников уже в значительной мере утрачена. Однако, принимая во внимание значение этих данных для здоровья ребенка, гармоничного формирования его личности, рационального питания, эффективного образования, спортивных занятий, оптимальной профориентации и возможности упредить развитие ряда болезней с поздней манифестацией, составление такого генетического паспорта в раннем возрасте представляется вполне оправданным уже сегодня. Возможный вариант генетической карты ребенка, основанный на результатах исследования генных ассоциаций, приведен на рисунке 8.3.

Нельзя исключить того, что по мере решения этических и социальных проблем, связанных с исследованиями генома человека (см. главу 10), генетическое тестирование будет проводиться достаточно широко и в более раннем возрасте, чем рекомендуется в настоящее время. Во всяком случае, в семьях высокого риска по диабету 1-го типа, бронхиальной астме, синдрому внезапной смерти, нарушениям сердечной проводимости и ритма, метаболическому синдрому и ожирению, а также при ряде других нозологий вполне оправданным представляется упредительное генетическое тестирование уже в раннем возрасте. Естественно, что проводится оно может только с согласия родителей, по направлению врача-педиатра и после консультации семьи врачом-генетиком.

Стремительно накапливается информация и о генах-маркерах, тестирование аллельных вариантов которых позволяет оценить пригодность

Год рождения
Национальность

Кариотип

Диагностика гетерозиготного носительства:

- Муковисцидоз;
- Миодистрофия Дюшенна;
- Гемофилия А;
- Фенилкетонурия;
- Аденогенитальный синдром;
- Спинальная мышечная атрофия.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ВРАЧА
РОДИТЕЛЕЙ, ВЫРАБОТКА
ТАКТИКИ КОРРЕКЦИИ ОБРАЗА
ЖИЗНИ, ПРАКТИЧЕСКИЕ
РЕКОМЕНДАЦИИ**

Тестирование наследственной предрасположенности

Бронхиальная астма: *GSTM1, GSTT1, GSTP1, CC16,*

IL4, IL4R, NOS1, TNFA

Остеопороз: *VDR; COL1A1*

Диабет 1-го типа: *DQA1, DQB1, MICA, CTLA4*

Артериальная гипертензия: *ACE, AGT, AGTR1, AGTR2, BKR, REN, ADRB2, ADRB1, MTHFR, NOS3, MTRR, APOE, APOC3, PPARG*

Наследственная тромбофилия: *MTHFR, F5, PAI1, FGB, ITGB3, F2*

Метаболический синдром: *APOE, APOC3, AGT, ACE, AGTR1, AGTR2, BKR, REN, ADRB1, ADRB2, DQB1, DRD2A, SR, IGF1, PPARG, PPARG, UCP2, UCP3, TNFA*

Лейкозы транслокации: *CYP1A1, GSTM1, CYP2C9, TPMT*

Трансплантология: *CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, TPMT*

Анализ генов, влияющих на формирование зависимости к алкоголю и наркотикам: *DRD2A, SR*

Предрасположенность к определенным видам спорта, фитнеса: *ACE, AGT, AGTR1, BKR, REN, AGTR2, MTHFR, ADRB2, ADRB1, APOE, NOS3, ITGB3, CD36, VDR, AR, AMPD1, PGC1A, CNB, ACTN3, DRD2A, SR, IGF1, PPARG, PPARG, UCP2, UCP3*

Устойчивость к ВИЧ-инфекции: *CCR5 (32del+)*

Рис. 8.3. Вариант генетической карты здоровья ребенка

подростка к тому или иному виду спорта. В настоящее время имеется информация о почти 150 различных генах, контролирующих физическое развитие человека, важных для правильного занятия фитнесом и для отбора потенциально перспективных спортсменов [751]. Некоторые из этих генов протестированы на группах спортсменов и в нашей лаборатории [11]. Полученные результаты позволили приступить к формированию собственного варианта генетической карты спортсмена, включающего тестирование некоторых генов, определяющих физические характеристики человека и подробно рассмотренных в разделе 7.4 (рис. 8.4).

Так, генотип *C/C* по полиморфизму гена *DRD2*, сниженное количество тетра nukлеотидных повторов TTTT в гене ароматазы (*CYP19A1*), генотип *I/I* гена ангиотензинпревращающего фермента *ACE* и гомозиготность по аланину продукта гена кальций-чувствительного рецептора *CASR* характерны для индивидов с повышенной физической активностью и выносливостью, то есть генетически более пригодных для занятий спортом (см. раздел 7.4).

Несмотря на известные ограничения юридического и морально-этического плана, недостаток информации о генных сетях различных метаболических процессов и мультифакториальных болезней,

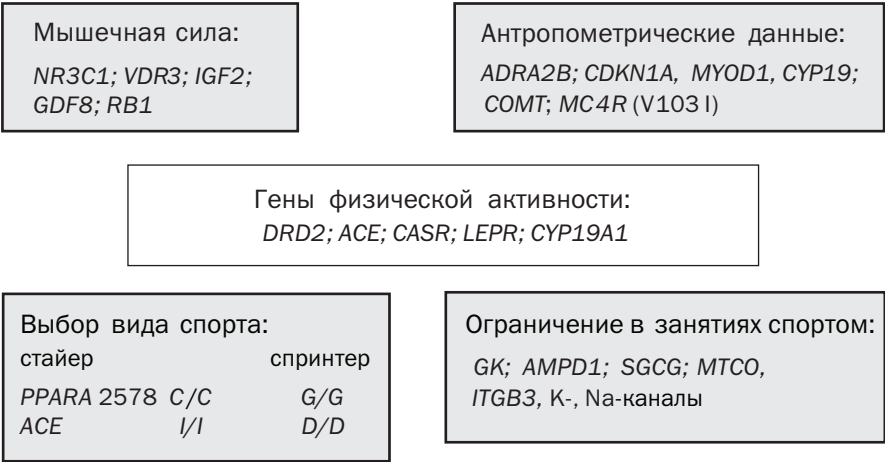


Рис. 8.4. Вариант генетической карты спортсмена

отсутствие убедительной статистической информации и несовершенство клинической интерпретации результатов генетического тестирования (см. главу 9), составление генетического паспорта любого объема для дееспособных граждан следует приветствовать. Данный медицинский документ может оказать существенную помощь при проведении экспертизы состояния здоровья, а также оценки потенциального риска развития ряда заболеваний у членов семьи высокого риска по тому или иному частому мультифакториальному заболеванию.

Таким образом, несмотря на перечисленные трудности и очевидное несовершенство современной предиктивной медицины, генетическое тестирование семей высокого риска по некоторым тяжелым мультифакторным заболеваниям, а также спортсменов-профессионалов, людей экстремальных профессий и лиц, заинтересованных в информации о своем геноме, представляется вполне реальным. Очевидна большая практическая значимость и генетической карты репродуктивного здоровья.

8.4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ БЛИЗКОГО БУДУЩЕГО

Быстрый прогресс в технологиях исследования генома человека, появление принципиально новых методов анализа генома и высоко-

производительных автоматических ДНК-анализаторов, позволяющих секвенировать в день участки ДНК протяженностью до десятков миллионов пар оснований (см. главу 4), резко сокращают время и удешевляют процесс расшифровки структуры генома человека. В мае 2007 года полную карту своего генома получил в награду за вклад в программу «Геном человека» активный инициатор этой программы, автор знаменитой двойной спирали ДНК профессор Джеймс Дюи Уотсон. Вскоре такие карты своего генома получили директор частного института по исследованию генома человека Крэйг Вентер и еще один из активных членов программы Джордж Черч. Важно отметить, что во всех случаях была представлена информация о первичной нуклеотидной последовательности сразу двух цепей ДНК, то есть можно было реально оценить состояние всех аллельных вариантов каждого гена. Все трое выдающихся ученых согласились разместить полные карты своих геномов в Интернете, совершенно не опасаясь за всемирное разглашение этой конфиденциальной информации. Стоимость такого индивидуального генома на сегодня составляет порядка 1 млн долларов США. Однако, согласно авторитетным научным прогнозам, уже в ближайшие 5–10 лет она снизится до 1 000 долларов, и вся информация о собственном геноме станет доступной для миллионов жителей нашей планеты!

Учитывая это обстоятельство, уже упоминавшийся американский ученый Джордж Черч предложил на суд общественности и ученых мира новую программу — **«Персонализированный геном»** [214]. Цель программы — провести сравнительный компьютерный анализ полноразмерных геномов многих тысяч людей, чтобы получить максимально полную информацию о связи генотип–фенотип, выяснить особенности ассоциации структуры генома, его полиморфизма, а также аллельных вариантов отдельных генов с той или иной патологией, в том числе с мультифакториальными заболеваниями. В рамках этой программы предполагается бесплатно секвенировать геном человека и вместе с его медицинской картой размещать его в Интернете для более детального и всестороннего исследования.

Таким образом, если сегодня доступны для анализа свыше 1 000 генов-маркеров, ассоциированных с различными патологическими состояниями, то уже в недалеком будущем (5–10 лет), учитывая стремительный прогресс генетики, это число возрастет до нескольких десятков тысяч (общее число структурных генов у человека оценивается величиной порядка 22–23 тысячи, см. главу 1). Естественно, что далеко

не все гены обретут статус генов предрасположенности (см. главу 2 и раздел 8.1), однако с помощью методов биоинформатики и общегеномного скрининга ассоциаций (см. разделы 4 и 6.2) все мажорные гены предрасположенности также будут скоро идентифицированы и точно определены их аллельные варианты, способствующие или, наоборот, препятствующие развитию того или иного мультифакториального заболевания.

Именно поэтому, несмотря на несовершенство уже существующих индивидуальных генетических карт (генетических паспортов), ограниченность данных о мажорных генах-маркерах, ассоциированных с заболеваниями, ограниченные прогностические возможности объективного консультирования по результатам генетического тестирования, работу в этом направлении следует максимально активизировать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предиктивная медицина, то есть медицина, основанная на клиническом понимании функций генома, его составных частей — генных ансамблей и индивидуальных генов в патологии человека, в настоящее время делает только первые шаги. По мере идентификации новых генов и генных сетей, выяснения их функций с помощью протеомики, новых данных о метаболических путях, информации о молекулярных механизмах, лежащих в основе тех или иных морфогенетических процессов, равно как и отдельных заболеваний, особенно мультифакториальных, роль предиктивной медицины в здравоохранении стремительно растет. В настоящей главе приведены лишь основные известные на сегодня гены, ассоциации которых с соответствующими болезнями уже установлены. В качестве примеров представлены возможные и уже разрабатываемые варианты индивидуальных генетических карт (генетических паспортов) общего профиля, генетической карты репродуктивного здоровья (разработанной в настоящее время наиболее подробно и находящейся на этапе клинического апробирования), генетической карты здоровья ребенка и генетической карты спортсмена. При всех недостатках и ограниченных прогностических возможностях, обращается внимание на то, что все эти карты составлены на основании многолетних исследований по генетическому тестированию популяции и больных соответствующими заболеваниями в Северо-Западном регионе РФ, а потому уже сегодня она может быть использована для прогностичес-

кого генетического тестирования ряда частых мультифакториальных заболеваний. Нет сомнения в том, что все это — только начальный этап в процессе познания роли отдельных генов и их ансамблей в патогенезе сложных мультифакториальных болезней. Многочисленные работы по анализу аллельных частот и поиску маркерных генов различных МФ-заболеваний активно проводятся в Научном центре медицинской генетики РАМН (Москва), НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск), в Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (Уфа), в НИИ цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск), НИИ физико-химической медицины (Москва). В этих центрах уже формируются панели генов-маркеров различных метаболических путей и частых заболеваний, реализуется, то есть уже находит практическое применение, идея генетического паспорта. Число генов в генных сетях неуклонно возрастает, а роль отдельных генов и их аллельных вариантов уточняется и нередко пересматривается.

На основании мониторинга индивидов после генетического тестирования и критического анализа результатов проспективного генетического анализа информация о возможностях досимптоматического (прогностического) генетического тестирования будет приобретать все большую практическую значимость. Принимая во внимание, что в результате стремительного развития молекулярных методов уже в скором времени будут идентифицированы все мажорные гены-маркеры мультифакториальных болезней, роль предиктивной медицины в системе здравоохранения будет быстро возрастать. Новая медицина потребует новых организационных изменений в системе подготовки врачей и медработников среднего звена, готовых к восприятию этих достижений современной генетики и их использованию на благо пациентов.

ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

ВВЕДЕНИЕ

Как следует из обзора литературы и вышерассмотренных данных (особенно главы 7, 8), тестирование генных ассоциаций, то есть поиск генов-маркеров, сцепленных с различными мультифакториальными заболеваниями (МФЗ), уже приобрело массовый характер во всем мире и широко представлено в исследованиях ведущих лабораторий и генетических центров России. Согласно мировым данным, тысячи полиморфных сайтов тестируется ежедневно для установления ассоциации с болезнями [359]. Для многих частых МФЗ уже идентифицированы или находятся в стадии изучения около 100 генов-кандидатов, в каждом из которых имеется несколько полиморфных сайтов разного функционального значения.

В последние годы с появлением подробной карты молекулярных маркеров (SNP — глава 2) и чипов с высокой разрешающей способностью (300–500 тысяч точек) для генетического тестирования все шире применяется метод общегеномного поиска ассоциаций (Genome Wide Association Studies — GWAS) [723]. С помощью этого метода уже идентифицированы сотни новых генов-кандидатов и анонимного полиморфизма, сцепленных, по крайней мере, с десятью наиболее частыми МФЗ, такими как диабет 1-го и 2-го типов, болезнь Крона, рак молочной железы, рак простаты, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и многие другие [723]. Общее число заболеваний, протестированных этим методом, уже достигло 176 и продолжает быстро увеличиваться. Сравнение особенностей распределения аллельных вариантов у больных определенным МФЗ и у здоровых уже привело к понятию

«геномный профиль МФЗ», представляющий собой **распределение по геному SNP-аллелей, характерное для определенного заболевания**. Возникли и активно рекламируют коммерческие генные тесты, в том числе и **«индивидуальные геномные профили»**, различные диагностические центры Америки (Celera, Myriad genetics, Decode, Navigenics, 23andme), и Западной Европы (Sciona, Gendia) [338]. При этом ассоциации многочисленных генов-маркеров и полиморфных локусов с заболеванием остаются недоказанными, а более 5 % уже выявленных ассоциаций оказываются случайными [359]. По мнению многих специалистов, в молекулярной медицине и медицинской генетике возникла достаточно тревожная ситуация, когда **коммерциализация и бизнес начинают опережать науку**.

Какие же основные проблемы стоят на пути широкого внедрения несомненных достижений предиктивной медицины в клиническую практику? Главные из них следующие.

1. Доказательство достоверности ассоциации определенного гена или полиморфизма с МФЗ.
2. Оценка результатов предиктивного генетического тестирования.
3. Полезность предиктивного генетического тестирования для человека.

Критическому рассмотрению этих проблем и посвящена настоящая глава.

9.1. ДОСТОВЕРНОСТЬ АССОЦИАЦИИ ГЕНОТИП–ФЕНОТИП ПРИ МФЗ

В настоящее время уже существует около 1024 клинических генетических тестов на МФЗ и более 300 генетических тестов проходят доклинические и клинические испытания [332]. Для многих МФЗ уже идентифицированы «главные» гены, вовлеченность которых в ту или иную патологию подтверждена исследованиями многих лабораторий на репрезентативных группах больных. К таковым, например, относятся болезнь Альцгеймера (*APOE4*), диабет 2-го типа (*PPARG*, *TCF7L2*, *KCNJ11*), старческая дегенерация желтого пятна сетчатки (*CFH*), системная красная волчанка (*JRF5*), рак простаты (регион *JF1H*), сахарный диабет 1-го типа (*HLA*, *INS*, *IL2RA*, *PTPN22*), аутоиммунный тиреоидит (*CTLA4*), болезнь Гиршпрунга (*RET*), болезнь Крона (*CARD15*), ревматоидный артрит (*PTPN22*) [169, 434]. Уже сегодня компьютерные базы

данных генетических ассоциаций содержат результаты 8 000 исследований по 70 заболеваниям, объединенным в 10 разных классов. Тем не менее, отношение к этим результатам многих ученых остается весьма скептическим, что в значительной мере определяется отсутствием строгих статистических доказательств наличия таких ассоциаций.

Одной из важных причин такого несоответствия являются сравнительно небольшие выборки групп больных и здоровых. В лучшем случае они ограничиваются сотнями субъектов, тогда как для получения статистически достоверных данных требуется сравнительный генетический анализ нескольких тысяч здоровых и больных [359]. Не случайно в исследованиях по общегеномному скринингу ассоциаций используется сразу несколько тысяч больных определенной нозологии и не менее 3 000 субъектов парного контроля (pair-matched control) [723, 797].

Другой причиной вариабельности генных ассоциаций могут быть популяционные различия аллельных частот. Не случайно выявленные аллельные различия, доказывающие значимость той или иной ассоциации, при объединении данных разных работ, выполненных на группах больных других популяций, нередко усредняются и становятся статистически недостоверными. Так, установленная для жителей Санкт-Петербурга ассоциация полиморфизма гена фактора некроза опухоли (*TNFA*) с инфарктом миокарда при мета-анализе с 19 другими работами отечественных авторов оказалась недостоверной [153].

Необходимость больших выборок диктуется сравнительно **невысокой частотой величины относительного риска (relative risk) — RR**, которая показывает, насколько чаще встречается изучаемое заболевание у лиц с определенным аллелем или набором разных аллелей соответствующих генов-маркеров по сравнению с индивидами с другим аллелем или аллелями тех же генов-кандидатов [80]. Обычно для уже известных генов-маркеров, ассоциированных с МФЗ, величина RR не превышает 1,5, а чаще находится в пределах 1,16–1,2. В силу этого реально вклад каждого гена-маркера в развитие МФЗ сравнительно невелик. Вследствие этого для строгого доказательства наличия ассоциации требуются обширные генетические исследования. Так, согласно некоторым оценкам, для доказательства неслучайной ассоциации гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) с ишемической болезнью сердца необходимо провести исследования на 11 162 больных ИБС и 12 578 группы контроля [359]. То же самое относится и к ассоциации с ИБС гена ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*) — не менее 5 000 больных и 6 000 контроля. Поскольку

ни для одного известного гена маркера подобные исследования проведены не были, некоторые авторы полагают, что все уже известные ассоциации генов с МФЗ пока не являются доказанными [576]. Считается, что для доказательства 90% вероятности какой-то ассоциации между геном и заболеванием при RR, равном 1,25, требуется исследование 5000 больных и не менее 5000 человек контрольной группы. При этом также предлагается увеличить в 1000 раз уровень значимости ($p < 0,00005$ вместо обычного $p < 0,05$) [359]. Появление метода общегеномного скрининга ассоциаций (см. главу 4) кардинально меняет ситуацию с проблемой достоверности предиктивного генетического тестирования. Так, при оценке риска ИМ этим методом при анализе 85SNP достоверность выявленных ассоциаций возросла до $p < 0,000\ 000\ 1$! [453].

Другим важным фактором, доказывающим состоятельность выявленной ассоциации, является ее репликативность, то есть воспроизводимость результатов тестирования в работах других исследователей. В настоящее время для анализа достоверности ассоциации аллельных вариантов разных генов широко применяются различные статистические методы, однако определенного консенсуса в этом вопросе пока не достигнуто [335].

С чем же связана такая вариабельность генетического полиморфизма, выявляемая при генетическом тестировании МФЗ? Тому есть много причин.

- Аллели, ассоциированные с одним и тем же МФЗ, в разных популяциях могут быть разными.
- Частоты аллелей в разных популяциях могут быть примерно одинаковы, но их вклад в патогенез исследуемой МФЗ может быть разным.
- Патогенетические различия МФЗ могут быть обусловлены особенностями действия внешних факторов в разных географических условиях.
- Неточности клинического диагноза (ошибки при формировании клинических групп).
- Генетическая стратификация изучаемой популяции (наличие в ней субпопуляций с исходно различной частотой анализируемых аллелей) [359].

Существует и ряд других факторов, существенно затрудняющих правильную оценку наблюдаемой ассоциации генотип–фенотип, даже если она вполне достоверная статистически.

- Отмеченная ассоциация может относиться не к идентифицированному гену-маркеру или какому-то локусу (аллелю), но к гену или

локусу (аллелю), тесно сцепленному с еще неизвестным локусом или аллелем, продукт которого вовлечен в патогенез МФЗ.

- Выявленная ассоциация может, в действительности, касаться не самого гена-кандидата, а другого гена, продукт которого функционально компенсирует эффект мутантного гена (**эпистатическое взаимоотношение генов**).
- Практически малоизученными остаются не только ген-генные взаимодействия но и взаимодействия генов-кандидатов с факторами внешней среды.
- Патогенез любого МФЗ может быть результатом нарушения функции генов одной, чаще разных генных сетей (см. главу 3).
- Наряду с типичными для МФЗ полигенными формами нередко встречаются и моногенные формы (остеопороз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, различные онкологические заболевания) [80].

Естественно, что все перечисленные факторы существенно смазывают клиническую картину заболевания, сильно затрудняют корректную идентификацию генов-маркеров и их оценку при мета-анализе работ различных авторов.

Признавая эти ограничения и все сложности, стоящие перед генетическим тестированием с целью поиска генов-маркеров МФЗ, важно обратить внимание на следующие обстоятельства.

- **Для всех МФЗ взаимоотношения генотип–фенотип всегда носят вероятностный характер, а не являются строго детерминированными, то есть точность ДНК-диагностики МФЗ, в отличие от моногенных, никогда не приблизится к 100 %.**
- **Группы больных и здоровых в работах по общегеномному скринингу ассоциаций действительно включают в себя тысячи человек, что практически гарантирует достоверность полученных результатов.**
- **Уже выявленные при общегеномном скрининге маркерные гены и локусы всегда включают в себя ассоциации, ранее установленные другими методами (случай-контроль, семейный анализ, метод QTL и др.).**
- **Рассмотренные в предыдущих главах панели генов, ассоциированных с разными МФЗ в Северо-Западном регионе России, с небольшими различиями хорошо соответствуют таковым при тех же заболеваниях в Центральном и в Волго-Уральском регионах европейской части РФ, а также в Сибири).**

Конечно, эти положения нуждаются в дальнейших уточнениях и проверках, однако уже сейчас они дают основания для более масштабных доклинических и клинических испытаний ранее идентифицированных генов-кандидатов распространенных МФЗ.

Особенно удобными для генетического тестирования являются МФЗ, молекулярную основу которых составляют гены преимущественно одной генной сети, как, например, тромбофилия (гены свертывания крови), эссенциальная гипертензия (гены ренин-ангиотензинового каскада), нарушения липидного обмена (гены липидного обмена), индивидуальная чувствительность к лекарственным препаратам (гены системы детоксикации) и др. Тестируя аллельные варианты таких генов, можно получить достаточно объективную информацию о состоянии той или иной метаболической системы, оценить риск заболевания и применить соответствующие профилактические меры.

Значительную сложность для оценки результатов генетического тестирования представляют МФЗ с заведомо более сложной этиологией, в патогенезе которых задействовано несколько или даже много различных генных сетей, например бронхиальная астма, остеопороз, эндометриоз, гестоз, привычное невынашивание. Тестирование генов разных метаболических путей зачастую не позволяет выявить слабое звено, таящее угрозу для здоровья. Однако и в этом случае сопоставление клинических, лабораторных и генетических данных позволяет уточнить диагноз и дать рекомендации по лечению. Более подробно эта тема рассмотрена в следующем разделе.

9.2. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРЕДИКТИВНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Генетическое тестирование все шире внедряется в клиническую практику, что стимулируется возрастающими потребностями населения в высоких технологиях охраны здоровья. При этом самым слабым звеном в предиктивной медицине остается оценка результатов генетического тестирования, которая должна проводиться с учетом уже накопленных знаний по генным сетям конкретных МФЗ, популяционных, гендерных и возрастных особенностей частот полиморфных аллелей (см. 9.1).

Учитывая сугубо вероятностный характер генетических прогнозов при тестировании наследственной предрасположенности к МФЗ, опре-

деленную помощь в оценке риска наследственной предрасположенности уже сегодня может дать достаточно простой метод балльных оценок, который применяется в ряде западных стран (Harvard School of Public Health). Он также используется в некоторых отечественных центрах, проводящих генетическое тестирование (НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН) [97, 159, 168]. Суть метода заключается в следующем: каждый вариант генотипа оценивается в условных баллах в зависимости от того, являются ли выявленные аллели протективными или предрасполагающими к развитию патологии. По исследованным генам суммируют все баллы и условно оценивают риск заболевания как средний, низкий или высокий (см. пример в разделе 6.5). Некоторые варианты балльных оценок помимо обсчета баллов генотипов включают в себя также условные баллы для различных экзогенных факторов (вредные воздействия, привычки, прием лекарственных препаратов и пр.) и антропометрические данные, а также физическую активность, пол, вес.

После генетического тестирования обследуемый получает заключение, в котором указаны протестированные гены, их полиморфные варианты; согласно генотипу дается оценка риска с указанием, при необходимости, дальнейших лечебно-диагностических и профилактических мероприятий. Эта информация подготавливается врачом-генетиком совместно со специалистом, проводившим молекулярный анализ, и передается отдельно лечащему врачу и пациенту. Сопоставление этого заключения с результатами клинических, лабораторных и инструментальных исследований позволяет оценить риск развития того или иного МФЗ и предложить максимально эффективную **программу профилактики** и лечения.

Следует иметь в виду, что такой упрощенный вариант оценки индивидуального риска скорее подходит для анализа результатов генетического тестирования в пределах одной достаточно четко очерченной генной сети, контролирующей одну метаболическую цепь (например, системы детоксикации, свертывания крови, сосудистого тонуса, липидного обмена). Суммировать баллы по генам разных сетей, совместно вовлеченных в патогенез большинства МФЗ (бронхиальная астма, остеопороз, сердечно-сосудистые заболевания, эндометриоз и др.) вряд ли оправданно. В таком случае лучше проводить подсчет баллов по каждой генной сети отдельно и затем, сопоставляя полученные результаты с данными лабораторных и клинических исследований, пытаться решить, к какой группе риска следует отнести тестируемого пациента.

Ответ может быть более объективным, если есть возможность сравнить полученные результаты с данными по генетическому тестированию близкого родственника, уже имеющего данное МФЗ. В любом случае ответ будет носить сугубо вероятностный характер.

Существенную помощь в правильной интерпретации полученных результатов может оказать специальная компьютерная программа. Один из ее вариантов разработан во Франции и уже используется в медицинской практике [44]. Ее главная отличительная особенность заключается в рациональном совмещении результатов генетического тестирования с клиническими и анамнестическими данными, на основании которых составляется заключение, даются конкретные рекомендации по сохранению здоровья и профилактике болезней. Основной упор при этом делается на оценку результатов различных генетических тестов, прежде всего, тестов по определению аллельного полиморфизма генов системы детоксикации. Необходимость такой программы продиктована всем ходом становления и развития предиктивной медицины. Действительно, информация об особенностях аллельного паттерна различных генных панелей, обработанная с помощью такой программы, позволяет врачу-генетику получить достаточно объективную информацию о предрасположенности субъекта к тому или иному заболеванию, более обоснованно судить о его медицинском прогнозе, более аргументированно проводить медико-генетическое консультирование по вопросам специального образования, выбора профессии, занятиям спортом и фитнесом, диетотерапии и пр.

Разработаны и уже используются специальные компьютерные программы, позволяющие проводить сравнение геномных профилей больных с МФЗ, контрольной группы и конкретного пациента и оценивать риск наследственной предрасположенности к МФЗ конкретного человека [723]. Кроме того, международной группой ученых завершено создание карты большинства основных комбинаций в геноме человека. Карта облегчает врачам проведение анализа результатов тестирования, помогает находить генные вариации, соответствующие определенным заболеваниям, и отслеживать их передачу по наследству. Считается, что такая карта поможет снизить стоимость поиска генов предрасположенности к тому или иному МФЗ, а также сделает реальным разработку индивидуального лечения [502]. Нет сомнений в том, что создание подобной компьютерной программы для оценки результатов генетического тестирования в России также могло бы существенно ускорить внедрение предиктивной медицины в клиническую практику.

Согласно зарубежным данным, уже разработаны и достаточно широко используются тесты для оценки наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, венозным тромбозам, гиперлипидемии, атеросклерозу [502]. Быстро увеличивается число тестов на определение индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам (см. раздел 7.2). Частными коммерческими центрами Америки и Европы разработаны и уже широко практикуются различные панели генов и полиморфных сайтов (ПС). Так, диагностический центр по предиктивной медицине в Люксембурге (Laboratoires Reunis) предлагает для практикующих врачей-специалистов в области медицины антистарения устоявшиеся и уже хорошо зарекомендовавшие себя на практике следующие панели генов: специальной физической активности (25 генов, 28 ПС), кардиоваскулярного риска и стресса (19 генов, 22 ПС), метаболизма кальция и остеопороза (9 генов, 11 ПС), стоматологическая панель (8 генов, 10 ПС), рака простаты (1 locus, 10 ПС), специальной дерматогеномики (6 генов, 7 ПС), фармакогенетическая панель (6 генов, 17 ПС), ВИП-панель (47 генов, 64 ПС), нутригеномная панель (14 генов, 18 ПС), панель антистарения (19 генов, 24 ПС), панель женского здоровья (23 гена, 28 ПС), панель мужского здоровья (19 генов, 23 ПС) (www.i-e-p-r.org). Естественно, что применяемые генетические анализы пока не имеют сертификации тестов, пригодных для клинического применения, однако они широко используются практикующими специалистами, в том числе и врачами, работающими в области медицины антистарения. Кстати, на уровне генетических анализов находятся еще более 1 000 предиктивных генетических тестов, многие из которых проходят доклинические и клинические испытания. Среди них такие гены, как *APOE* аллель *e4*, гомозиготность по которому в 14 раз увеличивает риск болезни Альцгеймера у европейцев, ген *Filaggrin*, мутации которого *R501X* или *2282del14* в 4 раза увеличивают риск атопической экземы и тяжелых форм бронхиальной астмы, неблагоприятные аллели гена *CDKN22a2b* (на 64% увеличивают риск ИМ) и гена *INK 4a/4b* (вдвое возрастает риск диабета тип 2). Однако клиническое значение этих генетических тестов остается неясным, их полезность для врачей и пациентов требует более строгих доказательств [453].

16 августа 2007 года успешно прошел сертификацию и получил официальное одобрение Администрации по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (Food & Drug Administration) первый предиктивный генетический тест для расчета индивидуальной дозы антикоагулянта варфарина. Тест включает в себя

результаты генетического тестирования генов *CYP2C9*, *VKORC1* + возраст + пол + вес пациента.

Таким образом, несмотря на уже существующий массив данных, официально разрешенным для клинического применения в настоящее время является только тест на чувствительность к варфарину. Комиссией EuroGentest в Европе также разработано специальное положение о стандартизации генетического тестирования и подготовлена необходимая документация для сертификации тех генетических анализов, которые по результатам клинических испытаний могут быть уже переведены в разряд генетических тестов и, соответственно, могут быть рекомендованы для широкого клинического применения [347; <http://www.eurogentest.org/unit/workshops.xhtml>].

9.3. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Реальная польза от генетического тестирования может быть только в том случае, если оно завершается полноценной консультацией квалифицированного специалиста по медицинской генетике, с предоставлением соответствующих рекомендаций для лечащего врача и пациента. Результаты генетического тестирования могут иметь практическую значимость, если они основаны на анализе генов, ассоциация которых с соответствующим заболеванием показана в популяции данного региона (см. раздел 9.1), если обследуемый является членом семьи высокого риска, где уже есть больной с данной патологией, если проведен адекватный статистический анализ полученных генетических данных (см. раздел 9.2). Эффективность использования такой информации во многом определяется уровнем генетических знаний врачей, их умением применять полученные данные для диагностики, профилактики и лечения заболевания, а также готовностью самого пациента следовать рекомендациям врачей по результатам генетического тестирования [159]. Важно, однако, всегда помнить, что к интерпретации результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности следует относиться очень осторожно. Генетическое тестирование дает только ориентировочные результаты. По возможности, оно должно быть дополнено соответствующими биохимическими анализами, позволяющими оценить функциональную активность исследованных генов. Его важным составляющим является длительное мониторингирование состояния пациента после ГТ. Учитывая сложность патогенеза мультифак-

ториальных болезней, неопределенность первичного звена патологического процесса, более объективная информация, как уже упоминалось, может быть получена при тестировании генов, контролирующих лишь какой-то один метаболический процесс, то есть относящихся к одной генной сети. Так, уже сегодня на основании генетического тестирования достаточно объективно можно оценить функциональное состояние систем детоксикации, свертывания крови, липидного или углеводного обменов, ренин-ангиотензиновой системы и других. Серьезным препятствием на пути внедрения в практику уже имеющихся научных разработок, прошедших доклиническое испытание, является недостаточная осведомленность врачей в области современной медицинской генетики вообще, по предиктивной медицине и генетическому тестированию, в частности. Между тем, по нашему опыту, направлять пациентов на генетическое тестирование должен непосредственно врач-генетик, который заранее выясняет анамнестические особенности пациента и, по возможности, сам рекомендует для тестирования ту метаболическую систему, наследственная патология которой представляется особенно вероятной.

На основании результатов генетического тестирования, анамнестических, клинических и лабораторных данных врачу-генетику или лечащему врачу следует выдать пациенту заключение, которое должно содержать не только анализ результатов тестированной наследственной предрасположенности, но и включать в себя рекомендации, важные для максимально эффективной и полноценной жизни пациента. В случае установления факта наследственной предрасположенности к тому или иному заболеванию особенно существенной представляется разработка комплекса конкретных диагностических анализов и лечебно-профилактических рекомендаций, направленных на предотвращение развития прогнозируемого заболевания у пациента [34, 35].

Важно обратить внимание на наметившийся в последнее время разрыв между реальными возможностями генетического тестирования как комплекса молекулярных методов исследования и явным недостатком клинических рекомендаций, которыми должно завершаться каждое генетическое тестирование. Широкое привлечение к решению этих вопросов специалистов по медицинской генетике, компетентных в вопросах диспансеризации и фармакотерапии, а также врачей-клиницистов соответствующего профиля (кардиологов, онкологов, пульмонологов, акушеров-гинекологов и др.), владеющих основами профилактической (предиктивной) медицины, в настоящее время представляется особенно актуальным.

Следует еще раз подчеркнуть, что любое генетическое тестирование в рамках предиктивной медицины оправданно лишь в том случае, если его результаты подкреплены серьезными медицинскими рекомендациями. Только при наличии грамотных специалистов по медицинской генетике, своевременно и правильно направляющих пациентов на генетическое тестирование и, что еще более важно, способных давать квалифицированную оценку результатов, такое тестирование оправданно. Само по себе генетическое тестирование, не подкрепленное квалифицированной медико-генетической консультацией и рекомендациями соответствующих специалистов, лишено смысла и по большому счету может считаться вредным. Генетическое тестирование и интерпретация его результатов быстро совершенствуются. Стремительный рост информации о состоянии здоровья уже протестированных индивидов, то есть их длительное мониторинговое лечение врачами соответствующего профиля или врачом-генетиком, направлявшим на генетическое исследование, дает все больше объективных данных для критической оценки и глубокого осмысления результатов проспективного генетического тестирования. Нет сомнения в том, что по мере накопления данных о новых генах-маркерах, появления новых, более совершенных панелей геномных профилей (см. раздел 9.1) оценки результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности будут становиться все более объективными, а прогнозы врачей и специалистов по предиктивной медицине — все более весомыми и востребованными.

Конечно, можно возразить, что пока практически все существующие генетические тесты на МФЗ не имеют доказательной базы, однако оценить пригодность уже существующих генетических тестов для пациентов и врачей можно только в условиях клинических испытаний. Проведение таких испытаний, дополненное тщательным мониторингом пациентов в зависимости от результатов ГТ и профилактических мероприятий, является важной задачей современной медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на множество уже существующих и постоянно появляющихся новых генетических тестов, многие из которых находятся на стадии клинических испытаний, отношение к возможностям прогностического генетического тестирования остается неоднозначным, а зачастую скептическим. Главная причина этих трудностей — отсутствие строгих

статистических доказательств ассоциации выявленных генов-маркеров с МФЗ. Сравнительно малочисленные группы больных и контроля, используемые в большинстве работ по генетическому тестированию, популяционная вариабельность аллельных частот изучаемых генов, низкий относительный риск выявленных ассоциаций для каждого отдельного гена-маркера создают значительные трудности для доказательства причинно-следственной связи между наличием определенного аллельного полиморфизма и МФЗ. Существуют многие другие превосходящие факторы, влияющие на большую вариабельность генетического полиморфизма и затрудняющие проведение такого анализа. Вместе с тем высокая повторяемость результатов генетического тестирования, ободряющие результаты общегеномного скрининга ассоциаций, хорошее совпадение уже используемых панелей генов-маркеров в разных диагностических центрах РФ, а также осознание того, что предиктивное генетическое тестирование имеет сугубо вероятностный характер, дают основания для более масштабных клинических исследований генетики МФЗ в нашей стране. При этом предпочтительными для тестирования являются МФЗ, молекулярную основу которых составляют гены-кандидаты одной метаболической системы, то есть одной генной сети. Для объективизации результатов генетического тестирования таких заболеваний может быть использован метод балльных оценок. Значительно более сложными для оценки результатов и прогноза наследственной предрасположенности являются МФЗ, обусловленные повреждениями сразу несколько генных сетей. Подсчет баллов в таких случаях целесообразно проводить по каждой генной сети отдельно. Большое значение имеет также сопоставление результатов генетических тестов с данными клинических и лабораторных исследований. Более надежная прогностическая информация может быть получена при сравнении генетического профиля тестируемого с таковым у больного из той же семьи. Итогом всякого генетического тестирования должна быть не только информация об особенностях аллельных вариантов проанализированных генов, но и соответствующие рекомендации для пациента и врача. «Генетическая» переориентация всего здравоохранения уже происходит в развитых странах Западной Европы и Америки. В скором будущем она достигнет и России. Значительное повышение уровня генетических знаний, особенно в области предиктивной медицины, у врачей всех специальностей — важнейшее условие эффективного внедрения впечатляющих достижений медицинской генетики и геномики в систему здравоохранения РФ.

ЭТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

ВВЕДЕНИЕ

Существенную сложность для внедрения предиктивной медицины в клиническую практику создают не только трудности объективной оценки результатов генетического тестирования, их правильная интерпретация и продуманные рекомендации, но и неосведомленность врачей и пациентов в отношении юридических, правовых и социальных вопросов, часто возникающих при генетическом тестировании наследственной предрасположенности.

По мнению руководителя программы «Геном человека» профессора Фрэнсиса Коллинза, ныне директора Института генетики человека (США), «вполне вероятно, что **к 2010 году каждый сможет узнать о своем слабом “генетическом” звене, своей наследственной предрасположенности к тому или иному хроническому МФЗ. Это позволит приступить к разработке эффективной индивидуальной профилактической программы, включающей изменения образа жизни, диеты и специализированной медицинской помощи. На смену малоэффективного, дорогого и часто бесполезного лечения уже сформировавшегося хронического МФЗ должна прийти персонифицированная, упреждающая медицина здорового человека.** Генетическое тестирование поможет не только подобрать оптимальные препараты, но и избавит человека от приема лекарств, вредных для его здоровья. Однако эта информация таит в себе опасность возможной генетической дискриминации со стороны работодателей и страховых компаний. **Генетическая информация не должна попадать в плохие руки.** Как сказал Антуан

де Сент-Экзюпери: “Ваша цель — не предвидеть будущее, но сделать его возможным”» [361].

Несмотря на то что научные доказательства в области предиктивной медицины пока очень спекулятивны и в лучшем случае вероятностны, уже многие хотят тестировать свою ДНК на гены предрасположенности, чтобы узнать склонность к наркомании, ожирению, к различным особенностям поведения, таким как склонности к риску, криминальным поступкам и проявлениям агрессии [716]. Неосведомленность в отношении реальных возможностей, целесообразности и последствиях предиктивного генетического тестирования, незнание современного состояния этических и правовых принципов предиктивной медицины только усугубляют социальную ситуацию, дезориентируют врачей и общественность. Между тем этот круг вопросов уже достаточно подробно проработан на международном (Всемирная организация здравоохранения, ЮНЕСКО) и европейском (Европейский парламент, Специальные комиссии Европейского общества медицинских генетиков) уровнях. Исчерпывающая информация о содержании этих документов представлена в серии отечественных публикаций, подготовленных Научным центром медицинской генетики РАМН (Москва) [101, 105, 106].

Таким образом, современная «эра геномики», ознаменовавшаяся широким внедрением генетического тестирования в медицину, породила ряд этических, правовых и социальных проблем, связанных с появлением новых возможностей и способов ущемления прав человека, его дискриминации по генетическим признакам, неправильным и некорректным использованием генетической информации.

Рассмотрению основных положений уже существующих документов по этическим и правовым аспектам генетических исследований, имеющим отношение, прежде всего, к предиктивному (упреждающему, досимптоматическому, предсказательному) тестированию, посвящена данная глава.

10.1. ДОБРОВОЛЬНОСТЬ, ИНФОРМИРОВАННОСТЬ И КОНФИДЕНЦИАЛЬНОСТЬ — ГЛАВНЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

В документах Независимой экспертной группы Европейского союза от 19–20 ноября 1999 года записано, что под «генетическим тестированием понимается любой тест, выявляющий генетические данные».

Отмечено также что основными рисками генетического тестирования являются риски социального и психологического ущерба.

Главные положения биоэтики сформулированы в документах ВОЗ еще в 1999–2001 годах. Они включают в себя 13 основных положений, которыми следует руководствоваться при проведении генетического тестирования [105].

1. Распределение общественных ресурсов в пользу наиболее нуждающихся (принцип справедливости).
2. Свобода выбора в отношении решения собственных генетических проблем (принцип автономии личности).
3. Добровольность при проведении всех процедур, включая тестирование и лечение; отсутствие принуждения со стороны правительства, общества, работников здравоохранения (автономия личности).
4. Уважение человеческих различий и тех, чье мнение в меньшинстве (автономия, принцип «не навреди»).
5. Уважение интеллекта человека, независимо от уровня его знаний (автономия).
6. Просвещение по вопросам генетики общества, медиков, преподавателей, религиозных деятелей (польза).
7. Тесное взаимодействие с пациентами и организациями пациентов (автономия).
8. Предупреждение дискриминации или предпочтений, основанных на генетической информации, при трудоустройстве, страховании, обучении (непричинение вреда).
9. Взаимодействие с другими профессионалами; привлечение в «команду» пациентов членов их семей (принцип взаимности в семьях предполагает ряд моральных обязательств супругов и членов их семей друг к другу в отношении обмена информацией, полученной при генетическом тестировании).
10. Использование при общении с пациентами и их родственниками понятного языка, уважительного для пациента как личности (автономия).
11. Регулярное общение с пациентом при использовании поддерживающего лечения (принцип «не навреди»).
12. Отказ от проведения тестов и процедур без медицинских показаний (это положение не относится к предиктивному генетическому тестированию).
13. Осуществление постоянного контроля за качеством службы, в том числе за качеством генетических тестов (принцип «не навреди»).

Все эти принципы медицинской генетики сформулированы еще в 1997 году и касаются как генетической службы в целом, так и ее отдельных направлений: генетического консультирования, генетического скрининга, досимптоматического (предиктивного) тестирования, работы ДНК-банков и баз данных ДНК и т. д.

Этические проблемы, возникающие при тестировании на носительство генов предрасположенности к распространенным заболеваниям, имеют свои особенности, прежде всего потому, что эта информация носит вероятностный характер. Ситуация осложняется тем, что при полигенном наследовании МФЗ играет роль не один, а несколько генов предрасположенности, каждый из которых вносит небольшой вклад в развитие заболевания, при этом значителен вклад внешней среды в развитие заболевания (см. Заключение книги). Основная роль медико-генетического консультирования при МФЗ касается оценки величины индивидуального риска и определения мер профилактики у лиц группы высокого риска. Как отмечено ранее (см. раздел 9.3), недостаточность информации о числе генов, вовлеченных в МФЗ, особенностей их взаимодействия между собой и с факторами внешней среды существенно затрудняют объективную интерпретацию результатов генетического тестирования.

Интересно обратить внимание на определенную эволюцию взглядов на предиктивное генетическое тестирование за последние десять лет. Констатируя, что тестирование на предрасположенность к распространенным болезням (анализ генов с низкой пенетрантностью) в настоящее время, по-видимому, еще не имеет большой клинической значимости, ВОЗ постепенно расширяет возможности его применения при условии соблюдения определенных этических принципов.

Так, до 2003 года ВОЗ рекомендовала проводить такое тестирование только в тех случаях, если его результаты могут быть использованы для профилактики или лечения заболевания, при условии полной информированности пациента и его добровольного согласия. Допускалось досимптоматическое генетическое тестирование при широко распространенных МФЗ для оценки риска возникновения заболевания и определения индивидуальных мер для его предупреждения у лиц с высоким риском [105].

В настоящее время ВОЗ допускает тестирование генетической предрасположенности, если соблюдаются следующие условия:

- тестирование лиц с семейным накоплением сердечно-сосудистых, онкологических и других болезней при условии, что полученная

информация может быть эффективно использована для профилактики и лечения;

- тестированию на предрасположенность должна предшествовать адекватная информация с разъяснением возможностей и ограничений генетического теста;
- тестирование должно быть добровольным, на основании информированного согласия;
- работодатели, страховые компании, школы, правительственные учреждения и другие третьи стороны не должны иметь доступа к результатам генетических тестов;
- досимптоматическое тестирование должно быть доступно взрослым с высоким риском, которые хотят провести тестирование даже при отсутствии лечения, после соответствующей консультации и получения информированного согласия [106].

Важно учитывать образование врачей и населения в области генетики. Существует опасность серьезных психологических проблем.

Уважение права личности на получение любой информации, касающейся собственного генома, на всех этапах генетического тестирования неоднократно подчеркивалось в соответствующих рекомендациях многих стран [101, 413, 462]. Данная информация особенно важна, если речь идет о приеме на работу, страховании или семейных отношениях.

В 1998 году Всемирной организацией здравоохранения было издано Положение, согласно которому «Работодатели, страховые компании, школы, государственные или любые другие третьи учреждения и лица не должны допускаться к результатам генетического тестирования» [462]. Соответственно, все банки данных, содержащие информацию о генетических тестах, должны иметь надежную защиту от любых возможных посягательств с третьей стороны. Во избежание возможной дискриминации в ряде стран принят соответствующий мораторий. Основные 13 этических принципов, которыми необходимо руководствоваться при сборе и хранении ДНК-данных, важных для клинических исследований, рассмотрены в специальной статье, посвященной организации Международной локус-специфической базы данных (Locus-specific databases [370]. База будет содержать всю информацию о полиморфных сайтах и мутациях, уже идентифицированных в геноме человека. Она находится в открытом доступе в Интернете и предназначена для широкого использования клиницистами и учеными, работающими в области функциональной геномики. База гарантирует анонимность ин-

формации, полную конфиденциальность, которую обеспечивает специальный этический комитет. Электронный адрес базы вариаций в геноме человека — <http://www.humanvariomeproject.org/index.php?p=News>.

10.2. СЛОЖНЫЕ, СПОРНЫЕ И ЕЩЕ НЕ РЕШЕННЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ И ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Несмотря на многочисленные регламентирующие акты и постановления, предиктивное генетическое тестирование таит в себе еще много этических проблем, требующих безотлагательного решения.

В частности, в соответствии с существующими правилами результаты генетического тестирования должны быть полностью объяснены тестируемому врачом-генетиком. Однако достаточно деликатным остается вопрос, **когда и как предоставлять обследуемому негативную информацию о его здоровье**. Желательно, чтобы такие сведения сообщались тестируемому после проведения соответствующей психологической подготовки. Возможно, в определенных случаях выдача такой информации, с учетом особенностей психики пациента, может быть задержана. Тестирование наследственных заболеваний с поздней манифестацией, для которых отсутствуют методы эффективной терапии (хорея Гентингтона, некоторые другие нейродегенеративные болезни), рекомендуется проводить **только по достижении пациентом совершеннолетия (после получения паспорта), когда тестируемый вправе и в состоянии сам решить, в какой мере ему необходима такая информация**. Следует, однако, иметь в виду, что неблагоприятные результаты генетического тестирования именно таких заболеваний нередко сопровождаются глубокой депрессией и даже попытками самоубийства.

Более оправданно тестирование различных заболеваний, генетическая природа которых достаточно хорошо изучена, например рака молочной железы, семейного полипозного рака толстой кишки, болезни Альцгеймера, злокачественных опухолей щитовидной железы. В этих случаях тестирование следует максимально поддерживать и рекомендовать, поскольку идентификация мутации в соответствующих генах позволяет выявить бессимптомных носителей, которым может быть назначено соответствующее упреждающее лечение и рекомендованы необходимые профилактические мероприятия.

Такие ситуации могут возникать только при превентивном тестировании, то есть тестировании мутаций, ответственных за возникно-

вление болезней с поздней манифестацией (семейный аденоматозно-полипозный рак толстой кишки, хорей Гентингтона, некоторые формы рака молочной железы, наследственные формы болезни Альцгеймера или Паркинсона и др.).

В случае предиктивного генетического тестирования подобная ситуация вряд ли возможна. Учитывая сугубо вероятностный характер генетического прогноза, в предиктивной медицине следует вообще избегать таких понятий, как «**хорошие**» или «**плохие**» гены. Само упоминание врачом **плохих генов** может иметь неблагоприятные социальные и психологические последствия. Наоборот, в беседе с пациентом следует акцентировать внимание на своевременность его обращения на предиктивное тестирование, возможность коррекции работы его генома с помощью диеты, пищевых добавок, изменения образа жизни, отказа от вредных привычек, а при необходимости и приема лекарственных препаратов [44]. Более того, недопустима **дискриминация** в отношении лиц, имеющих положительные результаты досимптоматического тестирования, учитывая влияние результатов генетического тестирования на психологическое благополучие лиц, здоровых на момент тестирования. Следует помнить, что излишняя директивность медико-генетического консультирования может привести к **стигматизации** тестируемого, то есть будет воспринята как причисление его (ее) еще в досимптоматический период к группе больных или нездоровых [105]. Важно, чтобы обследуемый был полностью осведомлен о самом тесте, его назначении, предиктивных возможностях и ограничениях. В частности, о невозможности точного прогнозирования самого заболевания, тем более о времени его начала или тяжести. Врач не должен настаивать на проведении генетического тестирования. Он должен с пониманием отнестись к свободе выбора тестируемого в отношении его участия в генетических исследованиях, уважать его **право знать или не знать результаты генетического тестирования** [340].

Тестируемый должен быть сам **заинтересован** в проведении теста и в его результатах. Однако ему не следует самому обращаться в лабораторию, **направлять на анализ должен лечащий врач**, а еще лучше, по нашему опыту, врач-генетик, достаточно осведомленный в области предиктивной медицины. **Следует приветствовать желание пациентов проходить генетическое тестирование** на предмет болезней сердца, сосудов, онкологических заболеваний, диабета, акушерской патологии, в отношении которых уже имеется достаточно большой

опыт. Оно особенно показано в семьях высокого риска, где уже имеется больной, у которого известны аллельные варианты всех генов-маркеров соответствующих панелей (тромбофилия, эссенциальная гипертензия, гиперхолестеринемия и др.). Достаточно четко установлены гены-маркеры и их функционально неполноценные аллели при таких частых заболеваниях, как остеопороз, бронхиальная астма, эндометриоз, гестозы, сердечно-сосудистые заболевания, диабет (см. 9.1.2). Естественно, что наиболее убедительные данные, доказывающие полезность предиктивного генетического тестирования, могут быть получены только в условиях проспективных генетических исследований, однако такие исследования требуют много времени и пока, насколько нам известно, ограничены лишь несколькими заболеваниями — сердечно-сосудистыми [62] и бронхиальной астмой [207] (см. Заключение).

Эта информация важна для предупреждения или лечения заболевания не только у самого тестируемого, но и для его супруги и близких родственников. Поэтому, в случае необходимости, врач должен **помочь** ему (ей) принять правильное решение, особенно, если раскрытие данной информации может быть существенным для их здоровья. Вместе с тем **принцип недирективности медико-генетического консультирования исключает навязывание врачом своего мнения**. В силу всех этих обстоятельств высказывается достаточно обоснованное мнение, что вместо обычного для генетического тестирования **«информированного согласия»** следует предлагать пациенту заключить **«информированный контракт»**, устанавливающий более тесный доверительный контакт между врачом и пациентом [340].

Согласно международным правилам [413], в исключительных случаях, когда здоровью близких тестируемого угрожает реальная опасность, которую можно предотвратить, **информация о высоком генетическом риске может быть предоставлена непосредственно родственникам**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время усилиями международных организаций, различных комиссий и экспертных групп разработаны достаточно подробные положения и регламентации, касающиеся этических, юридических и правовых вопросов исследований по медицинской генетике и генетическому тестированию. Подобные специальные законодательства и

правительственные распоряжения в России пока отсутствуют. Некоторые элементы правил поведения врача по отношению к пациенту регламентируются в «Основах законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (1993). В частности, в нем прописано право на конфиденциальность, на доступ к медицинской информации о состоянии собственного здоровья, требование получения информированного добровольного согласия на постановку любого теста. Существует проект закона «О правовых основах биоэтики и гарантиях ее обеспечения», но в силу слишком большого диапазона мнений он пока не принят. На стадии подготовки находится законопроект «О генно-инженерной деятельности применительно к человеку» [101].

В общих чертах основные постулаты, соблюдение которых обязательно при медико-генетических исследованиях на человеке, вполне соответствуют таковым для проведения генетического тестирования. Главные принципы биоэтики (добровольность, конфиденциальность, информированность) вполне универсальны и применимы ко всем видам генетических исследований, в том числе к превентивному (до-симптоматическая диагностика болезней с поздней манифестацией) и предиктивному (диагностика наследственной предрасположенности к МФЗ) видам тестирования. Вместе с тем предиктивное тестирование, результаты которого достаточно сложны для интерпретации и носят сугубо ориентировочный характер, настоятельно требует разработки своих алгоритмов и, соответственно, своих этических правил и положений, особенно в разделе упорядочения отношений между тестируемым и врачом. Разработка проблем биоэтики предиктивного тестирования особенно актуальна в связи с большим числом работ по поиску генов-маркеров МФЗ и заметным прогрессом в использовании таких данных для практических целей. Ситуация усугубляется еще и быстрой коммерциализацией работ в области генетического тестирования. Число тестов на предрасположенность к различным заболеваниям начинает активно рекламироваться фирмами-изготовителями и диагностическими центрами, предлагаться непосредственно врачам и населению через Интернет. Все это может иметь далеко идущие и пока трудно прогнозируемые последствия для здравоохранения [462].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая пространное повествование, хотелось бы напомнить любознательному читателю, что оно является дополненным изложением обширного массива научных и практических данных, накопленных в мире и в нашей лаборатории после выхода в свет первой отечественной книги на эту тему: «Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину», опубликованной еще в 2000 году.

Возникает вопрос: почему «предиктивная»? В буквальном переводе “predictive” означает предсказательная. Кстати, именно так и предлагает называть это направление академик Н. П. Бочков [59]. Однако термин “predictive medicine” появился с легкой руки нобелевского лауреата Жана Доссэ еще в 1977 году [381]. В мировой литературе уже прочно укрепилось понятие «предиктивное генетическое тестирование» как тестирование, направленное на выявление наследственной предрасположенности человека к какой-то определенной мультифакторной болезни задолго до появления клинических симптомов или тенденций. Для определения генетического тестирования на фоне уже имеющейся склонности к какой-то хронической болезни, а также при тестировании наследственных болезней с поздней клинической манифестацией (хорея Гентингтона, семейный аденоматозно-полипозный рак толстой кишки, семейный рак молочной железы и яичников, семейные формы болезней Паркинсона и Альцгеймера) часто пользуются понятием «превентивное тестирование» (отсюда — preventive medicine). В отличие от хорошо всем знакомой лечебной медицины (curative medicine), как предиктивная, так и превентивная медицина относятся к досимптоматическим фазам заболевания. Для их совместного обозначения в отечественной научной литературе даже предлагается ис-

пользовать понятие «досимптоматическая медицина». Научный журнал с одноименным названием начал выходить в России с 2007 года. Естественно, что, за исключением болезней с поздним клиническим проявлением, разделение медицины на предиктивную и превентивную весьма условное, в результате чего эти термины в научной литературе часто применяются как взаимозаменяемые. Именно в таком широком смысле в нашей книге используется и термин «предиктивное генетическое тестирование».

Что главное произошло в предиктивной медицине после 2000 года?

Каков ее официальный статус в постгеномную эру?

Получила ли она научное и общественное признание?

Что мешает ее широкому внедрению в клиническую практику?

Каково современное состояние генетического паспорта?

Что его ожидает в недалеком будущем?

Каковы ближайшие и отдаленные перспективы предиктивной медицины?

Ответы на эти и некоторые другие вопросы, возникающие при знакомстве с книгой, и являются целью завершающего раздела данной монографии.

1. ГЛАВНЫЕ СОБЫТИЯ

Стремительное развитие получил поиск генов-маркеров, ассоциированных с МФЗ. В результате популяционного генетического анализа идентифицированы тысячи новых генов-маркеров, аллельные варианты которых предрасполагают к развитию патологических процессов (1); созданы генетические панели большинства частых хронических заболеваний (2); идентифицированы главные гены-маркеры, определяющие тяжесть течения болезни, предрасположенность к тем или иным осложнениям (3).

Беспрецедентные по масштабу исследования по генотипированию представителей разных рас, национальностей и этнических групп потребовали совместной напряженной работы клиницистов и молекулярных биологов. Итогом их работы стали многочисленные банки ДНК-данных, содержащие информацию о всех уже известных мутациях и вариациях ДНК, ассоциированных с хроническими заболеваниями (4).

Обширная информация по генотипированию частых хронических заболеваний у жителей РФ накоплена к этому времени и во многих научных центрах РФ: Институт медицинской генетики СО РАМН (Томск),

Научный центр медицинской генетики РАМН (Москва), Биологический научный центр РАН (Уфа), НИИ общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (Москва), Институт молекулярной генетики РАН (Москва), Институт молекулярной медицины РАМН и др. Только в нашей лаборатории НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН за это время были изучены частоты аллельных вариантов 80 генов-маркеров почти у 5 000 больных с различными частыми МФЗ (см. главу 6) и у такого же числа человек в группах контроля. Результаты этих исследований и составили основу данной монографии (см. главы 6 и 7).

Стремительный прогресс генотипирования МФЗ стал возможным благодаря существенным методическим усовершенствованиям, появлению новых эффективных автоматических и полуавтоматических методов ДНК-анализа (5). Особо следует отметить появившуюся в последние годы **технология общегеномного скрининга ассоциаций (Genome Wide Association Screening — GWAS)**, представляющую собой удивительный по своим возможностям сплав программы MapMap (карта однонуклеотидных замен гаплоидного генома человека), технологии биочипов высокой плотности (300–500 тысяч точек) и специальной компьютерной программы обработки результатов (6). Технология GWAS позволяет сравнивать частоты вариаций сразу по миллионам полиморфных сайтов, а наличие точной информации о локализации SNP в гаплоидном геноме человека — точно идентифицировать гены-кандидаты, ассоциированные с МФЗ. Исследования с помощью GWAS проводят на тысячах больных с четко установленным клиническим диагнозом; результаты сравнивают с таковыми, полученными на такой же или большей по числу контрольной группе (до 15 000 человек), что резко повышает достоверность выявленных ассоциаций. В уже проведенных исследованиях с помощью этой технологии были уточнены геномные профили, найдены новые гены-маркеры и идентифицированы неблагоприятные (редкие) аллели почти 10 различных МФЗ, в том числе диабета 1-го и 2-го типов, болезни Крона, бронхиальной астмы, остеопороза и др. (см. главу 8). Выявленные межпопуляционные вариации генных панелей и аллельных частот доказывают, что предварительный GWAS необходим для создания оптимальной генетической панели любого МФЗ. Внедрение технологии GWAS снимает одну из наиболее сложных проблем предиктивной медицины — проблему доказательности неслучайной ассоциации гена-кандидата, точнее его аллеля или SNP-полиморфизма какого-то локуса с конкретным МФЗ. Есть все основания предполагать, что с помощью технологии GWAS бу-

дуг четко установлены гены-кандидаты всех наиболее частых МФЗ уже в течение ближайших нескольких лет. Правда, учитывая популяционные и этнические особенности МФЗ, это не снимает необходимости проведения подобных исследований и в России. Следовательно, с помощью технологии GWAS должны быть протестированы МФЗ разных популяций и разных этнических групп, что, учитывая отсутствие этой технологии в России, создает серьезные трудности.

2. НАУЧНОЕ И ОБЩЕСТВЕННОЕ ПРИЗНАНИЕ

Наряду с другими направлениями геномики (молекулярная медицина, геномная дактилоскопия, функциональная геномика и др.), предиктивная медицина получила официальный статус научного направления, основу которого составляет поиск генных ассоциаций, определяющих наследственную предрасположенность человека к частым хроническим МФЗ. Для каждого МФЗ в настоящее время уже идентифицированы десятки генов-кандидатов, в том числе для некоторых МФЗ найдены «главные» гены, установлены популяционные частоты редких аллелей, наличие которых предрасполагает к болезни. **Исследования генных ассоциаций и идентификация генов предрасположенности составляют научную основу предиктивной медицины.** Они способствовали быстрому развитию таких ее новых дочерних направлений, как **нутригеномика** (коррекция функции генов с помощью диеты (см. раздел 7.1), **фармакогенетика** (генетическое тестирование с целью определения особенностей индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам (см. раздел 7.2). В рамках этого направления, кстати, в 2007 году был официально сертифицирован первый предиктивный генетический тест (см. главу 10), **фармакогеномика** (тестирование с целью получения новых препаратов направленного фармакологического действия), **токсикогеномика** (зависимость токсического эффекта от аллельных вариантов генов системы детоксикации). Генетическое тестирование стало широко применяться в такой коммерчески оживленной области, как **медицина антистарения** (например дерматогеномика), а также в **геронтологии** (гены «старения» и активного долголетия — см. раздел 7.3). Однако основное внимание многочисленной армии исследователей привлекла сама предиктивная медицина как новый научный подход раннего досимптоматического выявления лиц с высокой наследственной предрасположенностью. Бурное развитие получили **кардиогеномика** (генетические тесты, сигнализирующие о состоянии

сердечной мышцы, сосудов, проводящей системы сердца, свертывающей системы крови (см. раздел 6.7.5), кровяного давления (см. раздел 6.6) и др.), **психогеномика** (тесты на моногенные и полигенные формы заболеваний ЦНС, наследственную предрасположенность к психическим болезням, патологическим состояниям и пристрастиям — см. раздел 6.5).

Таким образом, генетическое тестирование стало магистральным направлением научных исследований в медицинской генетике и в генетике человека XXI века. Это направление не только **получило научное признание, но и привлекло внимание врачей и широкой общественности** в плане новых возможностей раннего выявления лиц с высокой наследственной предрасположенностью к МФЗ. Вместе с тем зачастую недостаточно объективное освещение исследований по предиктивной медицине в печати и по телевидению породило много необоснованных и преждевременных надежд, вызывало повышенный интерес многочисленных коммерческих центров, которые по почте или через Интернет рекламируют и продают непосредственно потребителям панели генетических тестов. Возникла парадоксальная ситуация: **бизнес пошел впереди науки и, более того, — в ущерб науке**. Между тем, большинство предлагаемых генетических тестов пока не сертифицировано, они не соответствуют принципам доказательной медицины, их полезность для практической медицины требует более детального изучения (глава 9). Поэтому, строго говоря, клиническая востребованность предиктивной медицины все еще явно недостаточна, а само предиктивное генетическое тестирование нуждается в строгих доказательствах своей практической значимости.

Не следует, однако, забывать, что, подобно другим наукам и великим историческим открытиям, предиктивная медицина в своем развитии должна, согласно меткому определению Эрнеста Резерфорда, пройти три этапа: первый — «Да это — абсурд», второй — «В этом что-то есть», третий — «Так это все знают». Объективный и достаточно непредвзятый взгляд на предиктивную медицину, возникший в процессе кропотливой подготовки данной монографии, свидетельствует о том, что она благополучно преодолела первый критический этап, прошла большой отрезок пути во втором и вскоре (следующие 10 лет и дальше) будет процветать в третьем. Действительно, по мнению известных авторитетов в области генома человека Фрэнсиса Колинза, Виктора МакКьюсика, Лиины Пелтонен и других, золотой век предиктивной медицины наступит через 10–15 лет, но приблизить его можно уже сегодня.

3. НА ПУТИ К КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Основные трудности широкого внедрения предиктивной медицины в клиническую практику связаны со сложностью получения строгих научных доказательств наличия генных ассоциаций с МФЗ и пользы для пациента генетического тестирования наследственной предрасположенности (см. главу 9).

Относительно небольшой вклад каждого гена-маркера в МФЗ, отсутствие статистической достоверности результатов для многих уже известных генных ассоциаций, малые выборки пациентов, значительные межпопуляционные различия, сугубо вероятностная оценка результатов тестирования и, наконец, практически полное отсутствие данных об отдаленных результатах упредительного генетического анализа (проспективное генетическое тестирование) сильно затрудняют объективную оценку практической значимости уже известных генетических тестов (см. главу 9).

Главное на современном этапе — оценить значимость уже существующих и разрабатываемых ГТ. К сожалению, до сих пор большинство ГТ основываются только на первичных результатах генетического тестирования без учета их клинической полезности и достоверности [344]. Между тем, согласно генетическому досье (Gene Dossier), недавно разработанному Службой генетического тестирования Великобритании (United Kingdom Genetic Testingnetwork www.ukgt.nhs.uk), сертификация каждого нового ГТ должна включать информацию по следующим четырем пунктам.

1. Аналитическая точность использованного молекулярно-генетического метода детекции.
2. Клиническая достоверность ГТ — его способность диагностировать или предсказывать наличие или отсутствие определенного фенотипа.
3. Клиническая полезность ГТ — что нового дает ГТ для диагностики в сравнении с уже существующими диагностическими тестами.
4. Этическое, юридическое и социальное соответствие — ГТ должно быть ориентировано на определенную популяцию и нацелено на решение конкретной задачи (www.labtestonline.org.ru).

Вместе с тем признается, что, к сожалению, объективные методы клинической оценки ГТ в настоящее время отсутствуют. Британский фонд “Wellcome Trust”, ранее финансировавший программу «Геном человека», в 2008 году начал финансирование проекта, направленного

на улучшение и усиление доказательной базы генетического тестирования, а также подготовку справочника для координации и интеграции в клиническую практику ГТ с необходимыми разъяснениями их полезности для врачей и пациентов. При этом оценка клинической полезности ГТ приравнивается к фазе 3 клинических испытаний, однако остается неясным, должны ли они оплачиваться государством или фирмами, разрабатывающими и рекламирующими ГТ [436].

Таким образом, цель этого проекта — перевести предиктивную медицину от научных исследований особенностей генетического полиморфизма по идентификации генов-маркеров МФЗ на качественно новый уровень — уровень доказательной медицины.

Признавая все эти сложности и ограничения современного этапа развития предиктивной медицины, важно обратить внимание на следующие обстоятельства.

- Для всех МФЗ взаимоотношения генотип-фенотип всегда носят вероятный характер, а не являются строго детерминированными, то есть точность их ДНК-диагностики, в отличие от моногенных болезней, никогда не приблизится к 100 % и всегда будет оцениваться только как низкая, средняя или высокая.
- Обследованные группы больных и здоровых в работах, выполненных с использованием технологии GWAS, уже включают тысячи человек, что практически гарантирует статистическую достоверность полученных результатов (см. разделы 6.4 и 9.2).
- Уже выявленные при общегеномном скрининге маркерные гены и локусы всегда содержат ассоциации, ранее установленные другими методами (случай-контроль, семейный анализ, метод QTL и др.).
- Удобными для генетического тестирования являются МФЗ, молекулярную основу которых составляют гены преимущественно только одной генной сети, как, например, тромбофилия (гены свертывания крови), эссенциальная гипертензия (гены ренин-ангиотензинового каскада), нарушения липидного обмена (гены липидного обмена), индивидуальная чувствительность к лекарственным препаратам (гены системы детоксикации) и др. Тестируя аллельные варианты таких генов, можно получить достаточно объективную информацию о состоянии той или иной метаболической системы организма, оценить риск заболевания и применить соответствующие профилактические меры.
- Панели генов, ассоциированные с разными МФЗ в Северо-Западном регионе России, с небольшими различиями хорошо соответствуют та-

ковым при тех же заболеваниях в Центральном и в Волго-Уральском регионах европейской части РФ, а также в Сибири (см. главу 6).

Конечно, эти положения нуждаются в дальнейших уточнениях и проверках, однако уже сейчас они дают основания для более масштабных доклинических и клинических испытаний уже идентифицированных в России генов-кандидатов распространенных МФЗ.

4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ И БУДУЩЕЕ ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Как индивидуальная база ДНК-данных генетический паспорт уже давно существует, постепенно усложняясь по мере выявления все новых генных маркеров, увеличения числа генных сетей и панелей генов предрасположенности, определяющих наследственную склонность к МФЗ. Если на ранних этапах генетический паспорт представлял собой достаточно простую карту, включающую в себя результаты тестирования около 100 генов-маркеров, соответствующих генным панелям 15–20 распространенных хронических МФЗ (см. главу 8), то после появления технологии GWAS число генов-кандидатов резко увеличилось. Более того, для каждого заболевания с помощью этой технологии определяется свой характерный генетический профиль, соответствующий распределению по геному более 300–500 тысяч вариаций в карте однонуклеотидных замен (см. главу 2). Сравнение таких генетических профилей у больных и здоровых, а также с таковым у пациента позволяет с высокой степенью достоверности определить предрасположенность тестируемого к соответствующему заболеванию. Такая услуга уже стала коммерческой и широко рекламируется некоторыми американскими фирмами. Так, открывшаяся в январе 2008 года американская фирма “23 and Me” в рекламных целях подарила участникам Мирового экономического форума в Давосе 1000 бесплатных генетических тестов, содержащих панель генов «старения». Анализ множественных SNP-маркеров для диагностики риска уже проводят и многие другие, преимущественно американские, фирмы (Navigenics, Celera, Myriad Genetics и др.). Более 2000 генетических тестов, в том числе и панелей генов МФЗ, предлагает и бельгийская фирма Gendia (<http://www.gendia.net>).

Идея генетического паспорта становится все популярней и в России. Нередко его называют генетической картой (см. главу 8). Варианты таких генетических карт уже предлагаются различными институтами и

коммерческими предприятиями Санкт-Петербурга, Москвы, Уфы, Томска. Несколько вариантов таких паспортов разработаны и в Лаборатории пренатальной диагностики НИИ АГ им. Д. О. Отта РАМН (см. главу 8). Они включают в себя около 100 генетических тестов, составляющих основу генных панелей 12 МФЗ и тестирование скрытого носительства 10 распространенных моногенных заболеваний (см. главу 8). В связи со сложностью интерпретации результатов генетического тестирования (см. главу 9) «полноразмерный» генетический паспорт делается редко. Как показывает наш опыт и опыт других центров РФ, значительно более востребованным является тестирование генных панелей отдельных МФЗ, особенно тех, где патология обусловлена сочетанием неблагоприятных аллельных вариантов генов одной метаболической цепи (система детоксикации, липидный обмен, свертывание крови, эссенциальная гипертензия и др.). Оценка результатов генетического тестирования проводится с помощью системы подсчета баллов (см. раздел 8.2) и с обязательным учетом анамнестических, генетических и клинических данных [59, 168].

Сложности интерпретации результатов, научные, этические и социальные проблемы генетического тестирования подробно рассмотрены в главах 8, 9 и 10. Отметим только, что хорошая воспроизводимость генных панелей разных МФЗ в разных отечественных центрах, предшествующий популяционный анализ частот редких (функционально неблагоприятных аллелей), принципиальное совпадение генов-маркеров, изученных в РФ, с таковыми, идентифицированными методом GWAS, дают основания для доклинических и клинических испытаний существующих генных панелей (см. раздел 4).

Очевидно, что к результатам такого тестирования на современном этапе развития предиктивной медицины следует относиться с большой осторожностью. Клиническую полезность такого тестирования даже при использовании технологии GWAS еще необходимо доказать. Особую озабоченность вызывает отсутствие сведений о том, каким образом и какие именно факторы внешней среды провоцируют развитие МФЗ у конкретного человека. С этой целью перед научным сообществом уже поставлена задача количественно оценить генетические и экзогенные факторы риска и их комбинации в патогенезе МФЗ [340].

Несмотря на все сложности, внедрение предиктивной медицины в клиническую практику научно оправданно и стратегически неизбежно. Как было отмечено в пленарном докладе профессора Лероя Гуда (Сиэтл, США) на ежегодной конференции Европейского общества генетики чело-

века (Барселона, 2008), согласно научным прогнозам в области системной биологии и медицины, близкое будущее — это медицина четырех «П» (P): (Predictive (Предиктивная), Personalized (Персонализированная), Preventive (Превентивная), Participatory (Пациент понимает свой геном и активно участвует в выборе лечения). Концептуальную основу 4П-медицины составляет комплексный анализ всего генома (сиквенс или технология GWAS) и биохимический анализ органспецифических белковых биомаркеров сыворотки крови (двумерный электрофорез и метод масс-спектрометрии) с целью точной предиктивной диагностики и разработки персонализированного варианта лечения. Учитывая, что в техническом и в финансовом плане секвенирование целого генома человека уже возможно (3 месяца и 1 млн долларов) (см. главу 8), так же как и идентификация 2500 белков сыворотки крови, такой путь развития медицины будущего представляется вполне реальным. Кстати, **полностью секвенированный индивидуальный геном представляет собой наиболее совершенный вариант индивидуального генетического паспорта.** Принимая во внимание быстрый прогресс техники автоматического секвенирования (см. главу 4), уже через 5–10 лет каждый человек сможет получить полную карту своего генома всего за 1 000 долларов (см. главу 8).

Предвидя такое развитие событий, в странах Западной Европы и Америки уже ведется большая работа по интеграции геномики в исследования национального (общественного) здоровья, политику и клиническую практику. Знание генома необходимо интегрировать в доктрину здоровья каждой страны, при этом основное внимание отводится именно предиктивной медицине. Для этого, однако, еще надо разобраться, какую клиническую ценность представляет «повышенная генетическая чувствительность» и каким образом количественно, с соблюдением принципов доказательной медицины, оценить генетические и экзогенные риски [340].

Проникновение геномики в общество и в медицину можно ускорить, но остановить уже нельзя. В полной мере это относится и к предиктивной медицине и генетическому тестированию. Внедрение технологии общегеномного скрининга для идентификации всех генов-кандидатов МФЗ, сопоставление индивидуального профиля аллельных вариантов генов-кандидатов обследуемого с таковыми у больных данным МФЗ и у заведомо здоровых, подкрепленные отдаленными результатами проспективного генетического тестирования, откроют человечеству широкий путь в новую и такую многообещающую эру предиктивной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанова, А. А. Современные методы терапии больных с привычным невынашиванием беременности / Агаджанова А. А. // Русский медицинский журнал. — 2003. — № 1. — С. 3–6.
2. Адамян, Л. В. Генитальный эндометриоз: клиника, диагностика, лечение: метод. рекомендации / Адамян Л. В., Андреева Е. Н. — М., 1997. — 31 с.
3. Адамян, Л. В. Эндометриозы / Адамян Л. В., Кулаков В. И., Андреева Е. Н. — М.: Медицина, 2006. — 411 с.
4. Адамян, Л. В. Эндометриозы: руководство для врачей / Адамян Л. В., Кулаков В. И. — М.: Медицина, 1998. — 320 с.
5. Алгоритмы пренатальной диагностики в Санкт-Петербурге / Баранов В. С., Кузнецова Т. В., Иващенко Т. Э. [и др.] // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / ред. Маслеников А. Б. Вып. 5. — Новосибирск: Альфа Виста, 2004. — С. 29–80.
6. Александров, А. А. Повышенное артериальное давление в детском и подростковом возрасте (ювенильная артериальная гипертония) / Александров А. А. // РМЖ. — 1997. — № 9. — С. 559–565.
7. Алексеев, Н. А. Геморрагические диатезы и тромбофилии: руководство для врачей / Алексеев Н. А. — СПб.: Гиппократ, 2004. — 608 с.
8. Аллельные формы гена бета-цепи интегрина как фактор генетической предрасположенности к некоторым гинекологическим заболеваниям / Гигани О. О., Буянова Н. И., Соколова С. Л. [и др.] // Вестник РУДН. — 2003. — Т. 24, № 5. — С. 23–28.
9. Анализ ассоциации генов *VDR3* и *Col1A1* с постменопаузальным остеопорозом / Зазерская И. Е., Асеев М. В., Кузнецова Л. В. [и др.] // Остеопороз и остеопатии. — 2002. — № 2. — С. 2–6.
10. Анализ комбинаций генетических маркеров мышечной деятельности / Ахметов И. И., Астратенкова И. В., Дружевская А. М. [и др.] // Генетические, психофизические и педагогические технологии подготовки спортсменов: сб. науч. тр. — СПб., 2006. — С. 95–102.
11. Анализ полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы в популяции Северо-Западного региона России, у атлетов и у долгожителей / Глотов А. С., Глотов О. С., Москаленко М. В. [и др.] // Экологическая генетика. — 2004. — Вып. 4. — С. 40–43.

12. Анализ полиморфных аллелей генов, кодирующих ферменты 1-й и 2-й фазы детоксикации у больных эндометриозом / Иващенко Т. Э., Швед Н. Ю., Крамарева Н. Л. [и др.] // Генетика. — 2003. — Т. 39, № 4. — С. 525–529.
13. Анализ связи двух точковых мутаций –20А > Т и –262 С> Т в 5'фланкирующей области гена каталазы с предрасположенностью к бронхиальной астме в популяции русских жителей центральной России / Солодилова М. А., Иванов В. П., Полоников А. В. [и др.] // Генетика народонаселения и патология: сборник научных трудов. Вып 8. — Томск, 2007. — С. 123–124.
14. Анализ хромосомных транслокаций с участием гена *MLL* методом гибридизации с олигонуклеотидными микрочипами / Митяева О. Н., Наседкина Т. В., Жаринов В. С. [и др.] // Молекулярная биология. — 2004. — Т. 38, № 3. — С. 1–8.
15. Анисимов, В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / Анисимов В. Н. — СПб.: Наука, 2003. — 468 с.
16. Анисимов, С. В. Изучение влияния мелатонинов на экспрессию генов в сердце мышей с помощью микрочиповой технологии / Анисимов С. В., Богелер К. Р., Анисимов В. Н. // Доклады АН. — 2002. — Т. 383, № 2. — С. 1–6.
17. Арёфьев, В. А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / Арёфьев В. А., Лисовенко Л. А. — М.: ВНИРО, 1995. — 406 с.
18. Артамонов, В. В. Неблагоприятная экология и молекулярные системы перспективной диагностики высокого риска развития онкозаболеваний (на примере рака молочной железы) / Артамонов В. В., Любченко Л. Н., Немцова М. В., Залетаев Д. В. // Вестник НИИ мол. мед. «Молекулярная медицина и биобезопасность». — 2004. — Вып. 4. — С. 37–54.
19. Арутюнян, А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. — СПб.: Фолиант, 2000. — 104 с.
20. Ассоциация полиморфизма промоторной области гена *TNFA* с развитием атопической бронхиальной астмы / Останкова Ю. В., Иващенко Т. Э., Келембет Н. А. [и др.] // Экологическая генетика. — 2005. — Т. III. — С. 3–11.
21. Ассоциация полиморфных аллелей генов *ACE* и *eNOS* с развитием гестозов / Малышева О. В., Мозговая Е. В., Демин Г. С. [и др.] // Медицинская генетика. — 2003. — № 2. — С. 78–82.
22. Ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов с диабетической нефропатией у больных сахарным диабетом 1-го типа / Горашко Н. М., Шестакова М. В., Чистяков Д. А. [и др.] // Сахарный диабет. — 2002. — № 1(14). — С. 38–42.
23. Астратенкова, И. В. Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы и физическая активность / Астратенкова И. В. // Генетические, психофизические и педагогические технологии подготовки спортсменов: сб. науч. тр. — СПб., 2006. — С. 45–57.
24. Ахметов, И. И. Молекулярная генетика спорта: состояние и перспективы / Ахметов И. И. // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. — 2007. — № 5. — URL: http://kamgifik.ru/magazin/n5_0407.htm (дата доступа — 05. 04. 2008).
25. Баев, А. А. Программа «Геном человека», ее возникновение, содержание и развитие / Баев А. А. // Итоги науки и техники: геном человека. — 1990. — Т. 1. — С. 4–33.
26. Баймурадова, С. М. Патогенез, принципы диагностики, профилактики и терапии синдрома потери плода, обусловленного приобретенными и генетическими дефектами гемостаза: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. — М., 2007. — 48 с.

27. Балаболкин, И. И. Бронхиальная астма у детей / Балаболкин И. И. — М.: Медицина, 2003. — 320 с.
28. Балаболкин, М. И. Диагностика и классификация сахарного диабета / Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. // Сахарный диабет. — 1999. — Т. 3, № 4. — С. 11–17.
29. Баранов, В. С. Гены предрасположенности и «генетический паспорт» / Баранов В. С., Асеев М. В., Баранова Е. В. // Природа. — 1999. — № 3. — С. 17–27.
30. Баранов, В. С. Геном человека и гены «предрасположенности»: введение в предиктивную медицину / Баранов В. С., Баранова Е. В., Иващенко Т. Э., Асеев М. В. — СПб.: Интермедика, 2000. — 263 с.
31. Баранов, В. С. Молекулярная медицина — основа генной терапии / Баранов В. С. // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 684–695.
32. Баранов, В. С. Программа «Геном человека» как научная основа профилактической медицины / Баранов В. С. // Вестн. РАМН. — 2000. — № 10. — С. 27–37.
33. Баранов, В. С. Молекулярная медицина — новое направление в диагностике, профилактике и в лечении наследственных и мультифакториальных болезней / Баранов В. С., Айламазян Э. К. // Мед. акад. ж. — 2001. — Т. 3. — С. 33–43.
34. Баранов, В. С. Определение генетической предрасположенности к некоторым мультифакториальным заболеваниям. Генетический паспорт / Баранов В. С., Хавинсон В. Х.; ред. Хавинсон В. Х. — СПб.: Фолиант, 2001. — 48 с.
35. Баранов, В. С. Научные основы предиктивной медицины / Баранов В. С., Иващенко Т. Э., Баранова Е. В. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 4. — Новосибирск: Альфа-Виста, 2003. — С. 3–19.
36. Баранов, В. С. Экологическая генетика и предиктивная медицина / Баранов В. С. // Экологическая генетика. — 2003. — № 1. — С. 22–29.
37. Баранов, В. С. Генетические аспекты профилактики и лечения эндометриоза / Баранов В. С., Иващенко Т. Э., Швед Н. Ю., Крамарева Н. Л. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 5. / ред. Масленников А. Б. — Новосибирск: Альфа Виста. — 2004. — С. 136–156.
38. Баранов, В. С. Геномика и молекулярная медицина / Баранов В. С. // Молекулярная биология. — 2004. — Т. 38, № 1. — С. 1–7.
39. Баранов, В. С. Геном человека как научная основа предиктивной медицины / Баранов В. С., Баранова Е. В., Иващенко Т. Э. // Геномика — медицине / ред. Иванов В. И., Киселев Л. Л. — М.: Академкнига, 2005. — С. 361–379.
40. Баранов, В. С. Генная терапия: мечты, разочарования, перспективы / Баранов В. С. // Мед. акад. журнал. — 2006. — Т. 6, № 1. — С. 32–38.
41. Баранов, В. С. Геномика — основа геронтологии / Баранов, В. С. // Бреслеровские чтения: сб. — М., 2007. — С. 178–188.
42. Баранов, В. С. Генетические аспекты старения / Баранов В. С., Баранова Е. В. // Успехи геронтологии. — 2007. — № 2. — С. 26–34.
43. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / Баранов В. С., Кузнецова Т. В. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. — 640 с.
44. Баранова, Е. В. ДНК: знакомство с собой, или как продлить молодость / Баранова Е. В. — М.: АСТ, 2006. — 222 с.
45. Баскаков, В. П. Эндометриозная болезнь / Баскаков В. П., Цвелев Ю. В., Кира Е. Ф. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2002. — 452 с.
46. Беккер, С. М. Патология беременности / Беккер С. М. — Л.: Медицина, 1975. — 509 с.

47. Беневоленская, Л. И. Остеопороз — актуальная проблема медицины / Беневоленская Л. И. // Остеопороз и остеопатии. — 1998. — № 1. — С. 4–7.
48. Беневоленская, Л. И. Остеопороз. Диагностика, профилактика и лечение / Беневоленская Л. И., Лесняк А. И. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 171 с.
49. Бескоровайная, Т. С. Влияние аллелей полиморфизма генов системы HLA-II класса, фолатного обмена, гемостаза и детоксикации на репродукцию человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2005. — 23 с.
50. Беспалова, О. Н. Оценка роли генетических факторов в привычном невынашивании беременности ранних сроков: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2001. — 24 с.
51. Беспалова, О. Н. Анализ полиморфизма генов нейрональной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS) NO-синтаз при плацентарной недостаточности (ПН) и задержке внутриутробного развития плода / Беспалова О. Н., Тарасенко О. А., Иващенко Т. Э., Баранов В. С. // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2006. — Т. LV, № 1. — С. 57–63.
52. Беспалова, О. Н. Генетика невынашивания беременности / Беспалова О. Н. // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2007. — Вып. 1. — С. 81–96.
53. Биологическая роль оксида азота при сахарном диабете / Бондаренко О. Н., Галстян Г. Р., Анцифиров М. Б. [и др.] // Сахарный диабет. — 2002. — № 2(15). — С. 56–63.
54. Бокарев, И. Н. Тромбофилии, венозные тромбозы и их лечение / Бокарев И. Н., Бокарев М. И. // Клиническая медицина. — 2002. — № 5. — С. 4–9.
55. Боринская, С. А. Люди и их гены: нити и судьбы / Боринская С. А., Янковский Н. К. — Фрязино: Век-21 «Наука сегодня», 2006. — 67 с.
56. Бочков, Н. П. Вклад генетики в медицину / Бочков Н. П. // Рос. медицинский вестник. — 2001. — № 4. — С. 4–13.
57. Бочков, Н. П. Генетика человека и клиническая медицина / Бочков Н. П. // Вестн. РАМН. — 2001. — № 10. — С. 5–8.
58. Бочков, Н. П. Клиническая генетика / Бочков Н. П. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. — 1447 с.
59. Бочков, Н. П. Роль молекулярно-генетической диагностики в прогнозировании и профилактике возрастной патологии / Бочков Н. П., Соловьева Д. В., Стрекалов Д. Л., Хавинсон В. Х. // Клиническая медицина. — 2002. — № 2. — С. 4–8.
60. Бочков, Н. П. Медицинская генетика / Бочков Н. П. — М.: Академия, 2003. — 192 с.
61. Брызгунов, И. П. Первичная артериальная гипертензия у детей и подростков / Брызгунов И. П. // Вопросы современной педиатрии. — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 68–71.
62. Бычкова, О. Ю. Гены-кандидаты сердечно-сосудистых заболеваний: связь с продолжительностью жизни / Бычкова О. Ю., Макеева О. А., Пузырев В. П. // Генетика человека и патология. — Томск: Печатная литература, 2007. — С. 61–66.
63. Васильев, В. Б. Генетические основы митохондриальных болезней / Васильев В. Б. — СПб., 2006. — 146 с.
64. Викторова, Т. В. Взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов в процессе развития хронических обструктивных болезней легких / Викторова Т. В., Корытина Г. Ф., Янбаева Д. Г. // Медицинская генетика. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 50–59.
65. Влияние аллельных вариантов гена *VDR3* на скорость потери минеральной плотности костной ткани у женщин в ранней постменопаузе / Зазерская И. Е., Асеев М. В., Кузнецова Л. В. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2005. — Т. 54, № 2. — С. 23–30.
66. Выявление генетических факторов, детерминирующих индивидуальные различия в приросте мышечной силы и массы в ответ на силовые упражнения / Ахме-

- тов И. И., Нетребя А. И., Глотов А. С. [и др.] // Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряженных физических нагрузок: сб. статей. Вып. 3. — М., 2007. — С. 13–21.
67. Гайцхоки, В. С. Информационные РНК клеток животных / Гайцхоки В. С. — М.: Медицина, 1980. — 199 с.
68. Генетика / Иванов В. И., Барышникова Н. В., Билева Дж. С. [и др.]. — М.: Академкнига, 2006. — 638 с.
69. Генетические основы предрасположенности к акушерской и гинекологической патологии / Иващенко Т. Э., Швед Н. Ю., Беспалова О. Н. [и др.] // Молекулярная медицина. — 2007. — № 4. — С. 19–26.
70. Генетические предикторы неблагоприятного течения заболевания у больных ишемической болезнью сердца высокого риска по данным 2-летнего наблюдения / За-тейщиков Д. А. [и др.] // Кардиология. — 2004. — Т. 44, № 12. — С. 16–22.
71. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме / Иващенко Т. Э., Сиделева О. Г., Петрова М. А. [и др.] // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 1. — С. 107–111.
72. Генетические факторы предрасположенности к привычному невынашиванию беременности ранних сроков / Беспалова О. Н., Аржанова О. Н., Иващенко И. Н. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2001. — № 2. — С. 8–13.
73. Генетический анализ семей с сибсами, больными сахарным диабетом типа 1 / Носиков В. В., Серегин Ю. А., Титович Е. В. [и др.] // Сахарный диабет. — 2002. — № 1. — С. 34–37.
74. Геномика — медицине / ред. Иванов В. И., Киселев Л. Л. — М.: Академкнига, 2005. — 392 с.
75. Генофонд, геногеография и заболеваемость населения / Рычков Ю. Г., Балановская Е. В., Жукова О. В. [и др.] // Успехи современной генетики. — М.: Наука, 1996. — 205 с.
76. Гены ангиотензинпревращающего фермента, NO-синтазы и эндотелина-1 и гипертрофия миокарда левого желудочка у больных гипертонической болезнью коренных жителей Якутии / Минушкина Л. О. [и др.] // Кардиология. — 2005. — № 1. — С. 41–44.
77. Генные сети / Колчанов Н. А., Ананько Е. А., Колпаков Ф. А. [и др.] // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 617–629.
78. Геронтология *in silico*: становление новой дисциплины / ред. Марчук Г. И., Анисимов В. Н., Романюха А. А., Яшин А. И. — М., 2007. — 534 с.
79. Герштейн, М. Подлинная жизнь псевдогенов / Герштейн М., Чжэн Дю // В мире науки. — 2006. — № 11. — С. 47–53.
80. Гинтер, Е. К. Медицинская генетика / Гинтер Е. К. — М.: Медицина, 2003. — 447 с.
81. Гинтер, Е. К. Медико-генетическое описание населения Адыгеи / Гинтер Е. К. — Майкоп, 1997. — 223 с.
82. Гипергомоцистеинемия и полиморфизм генов метилентетрагидрофолатредуктазы как фактор риска развития артериальных и венозных тромбозов и атеросклеротического поражения сосудов / Шмелева В. М., Капустин С. И., Салтыкова Н. Б. [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2001. — № 1(5). — С. 144–145.
83. Глотов, А. С. Разработка и апробация тест-систем на основе гелевых биочипов для изучения генетического полиморфизма человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2006. — 18 с.

84. Глотов, О. С. Генетический полиморфизм и старение / Глотов О. С., Баранов В. С. // Успехи геронтол. — 2007. — Т. 20, № 2. — С. 35–55.
85. Голубева, О. В. Генетические факторы предрасположенности к аденомиозу / Голубева О. В., Иващенко Т. Э., Баранов В. С., Айламазян Э. К. // Ж. акуш. и жен. болзн. — 2007. — Т. LVI, № 2. — С. 25–38.
86. Горбунова, В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / Горбунова В. Н., Баранов В. С. — СПб.: Специальная Литература, 1997. — 284 с.
87. Горбунова, В. Н. Молекулярные основы медицинской генетики / Горбунова В. Н. — СПб.: Интермедика, 1999. — 213 с.
88. Горбунова, В. Н. Молекулярная неврология. Т. II: Заболевания координаторной пирамидной и экстрапирамидной систем. Болезни экспансии / Горбунова В. Н., Савельева-Васильева Е. А., Красильников В. В. — СПб.: Интермедика, 2002. — 362 с.
89. Грядунов, Д. А. Разработка методов полимеразной цепной реакции на олигонуклеотидных микрочипах для видовой идентификации микроорганизмов и определения их лекарственной чувствительности: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2002.
90. Дедов, И. И. Сахарный диабет в Российской Федерации: проблемы и пути решения / Дедов И. И. // Сахарный диабет. — 1998. — № 1. — С. 2–12.
91. Дедов, И. И. Сахарный диабет у детей и подростков / Дедов И. И., Кураева Т. Л., Петеркова В. А., Щербачева Л. Н. — М., 2002. — 391 с.
92. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / под ред. Н. Н. Петрищева. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003. — 184 с.
93. Донозологическая диагностика и первичная профилактика бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний / Федосеев Г. Б., Баранов В. С., Лаврова О. В. [и др.] // Донозоология. Возможности и перспективы. — 2007. — № 1. — С. 20–26.
94. Дружевская, А. М. Ассоциация полиморфизма гена ACTN3 с физической деятельностью и гипертрофией скелетных мышц при силовой тренировке / Дружевская А. М., Любаева Е. В., Нетреба А. И., Попов Д. В. // Сб. науч. тр. СПбНИИФК. — СПб., 2006. — С. 206–211.
95. Елисеева, Ю. Е. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль / Елисеева Ю. Е. // Вопросы медицинской химии. — 2001. — Т. 1. — С. 15–21.
96. Журавлева, И. А. Роль окиси азота в кардиологии и гастроэнтерологии / Журавлева И. А., Мелентьев И. А., Виноградов Н. А. // Клиническая медицина. — 1997. — Т. 75, № 4. — С. 18–21.
97. Зависимость между возникновением стабильной артериальной гипертензии у детей и полиморфизмом генов ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем / Глотов А. С., Иващенко Т. Э., Образцова Г. И. [и др.] // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, № 1. — С. 18–25.
98. Зильбер, А. П. Преэклампсия и эклампсия: клинко-физиологические основы и алгоритмы диагностики / Зильбер А. П., Шифман Е. М., Павлов А. Г. — Петрозаводск, 1997. — 52 с.
99. Зубаиров, Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Зубаиров Д. М. — Казань: ФЭК, 2000. — 367 с.
100. Иванов, В. И. Этико-правовые аспекты программы «Геном человека» / Иванов В. И., Юдин Б. Г. — М., 1998. — 189 с.
101. Иванов, В. И. Геномика и этика / Иванов В. И., Ижевская В. Л. // Геномика — медицине. — М.: Академкнига, 2005. — С. 349–360.

102. *Иванова, О. Н.* Молекулярно-генетический анализ ранних форм болезни Паркинсона / Иванова О. Н., Якимовский А. Ф., Пчелина С. Н. // Ученые записки. — 2005. — Т. XII, № 4. — С. 105–106.
103. *Иващенко, Т. Э.* Методы молекулярной диагностики генных болезней / Иващенко Т. Э., Асеев М. В., Баранов В. С. // Медицинские лабораторные технологии: справочник. Т. 2. — СПб.: Интермедика, 1999. — С. 603–617.
104. *Иващенко, Т. Э.* Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза / Иващенко Т. Э., Баранов В. С. — СПб.: Интермедика, 2002. — 255 с.
105. *Ижевская, В. Л.* Медицинская генетика и геномика: этические проблемы и подходы к их решению / Ижевская В. Л., Иванов В. И. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 3. — Новосибирск, 2003. — С. 27–48.
106. *Ижевская, В. Л.* Этико-правовые аспекты генетического тестирования и скрининга / Ижевская В. Л. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 9. — Новосибирск: Альфа-Виста, 2006. — С. 1–15.
107. *Иллариошкин, С. Н.* ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / Иллариошкин С. Н., Иванова-Смоленская И. А., Маркова Е. Д. — М.: МИА, 2002. — 590 с.
108. *Иллариошкин, С. Н.* Диагностика тринуклеотидных заболеваний / Иллариошкин С. Н., Клюшеиков С. А., Сломинский П. А. // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 5, № 2. — С. 40–48.
109. *Инге-Вечтомов, С. Г.* Генетика с основами селекции / Инге-Вечтомов С. Г. — М.: Высшая школа, 1989. — 591 с.
110. Интеграция генных сетей, контролирующих физиологические функции организма / Колчанов Н. А., Подколотная О. А., Игнатьева Е. В. [и др.] // Вестник ВОГИС. — 2005. — Т. 9, № 2. — С. 179–199.
111. Использование метода количественной ПЦР в реальном времени для поиска гетерозиготного носительства делеций /мультипликаций экзонов гена *PARK2* у больных с болезнью Паркинсона / Пчелина С. Н., Ханина Н. М., Демина Е. П. [и др.] // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / под ред. Масленникова А. В. Вып. 9. — Новосибирск: Альфа Виста, 2006. — С. 49–56.
112. *Капустин, С. И.* Молекулярно-генетические аспекты патогенеза венозного тромбозомболизма: дис. ... д-ра. биол. наук. — СПб., 2007. — 294 с.
113. *Касаткина, Э. П.* Современные подходы к ранней диагностике и лечению специфических осложнений сахарного диабета у детей и подростков / Касаткина Э. П., Одуд Е. А., Сивоус Г. И., Сичинава И. Г. // Сахарный диабет. — URL: <http://www.diabet.ru/Sdiabet/1999-02/6.htm> (дата доступа — 25. 03. 2009).
114. *Катохин, А. В.* ми-РНК — новые регуляторы активности генов у эукариот / Катохин А. В., Кузнецова Т. Н., Омельячук Н. А. // Вестник ВОГИС. — 2006. — Т. 10, № 2. — С. 241– 273.
115. *Келембет, Н. А.* Анализ полиморфных вариантов генов интерлейкина-4 и альфа-цепи рецептора интерлейкина-4 у больных бронхиальной астмой / Келембет Н. А., Гембичкая Т. Е., Иващенко Т. Э. // Материалы съезда медицинских генетиков. — Уфа, 2005. — С. 149.
116. *Келембет, Н. А.* Клинико-генетические особенности формирования бронхообструктивного синдрома при моногенных (муковисцидоз) и мультифакторных (бронхиальная астма) заболеваниях легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2005. — 23 с.

117. Киселев, Л. Л. Геном человека и биология XXI века / Киселев Л. Л. // Вестн. РАН. — 2000. — Т. 70, № 5. — С. 412–424.
118. Клинико-диагностическое значение факторов роста, интерлейкинов и вазоактивных компонентов в оценке характера осложнений беременности I триместра / Орлов А. В., Орлов В. И., Сагамонова К. Ю. [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2003. — № 2. — С. 4–6.
119. Кольман, Я. Наглядная биохимия: пер. с нем. / Кольман Я., Рем К.-Г. — М.: Мир, 2000. — 469 с.
120. Конформационные болезни мозга / Иллариошкин С. Н. [и др.]. — М.: Янус-К, 2003. — 246 с.
121. Корочкин, Л. И. Биология индивидуального развития / Корочкин Л. И. — М.: Изд-во МУ, 2002. — 263 с.
122. Косякова, Т. В. Сахарный диабет: генетические аспекты и возможности современной диагностики заболевания и его осложнений / Косякова Т. В., Кондратьева Е. И., Тарасенко Н. В., Пузырев В. П. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 4. — Новосибирск: Альфа-Виста, 2003. — С. 107–115.
123. Кочергина, А. А. Оптимизация тренировочного процесса юных лыжников с учетом их генетической предрасположенности / Кочергина А. А., Ахметов И. И. // Физическая культура: воспитание, образование, тренировка. — 2006. — № 1. — С. 35–36.
124. Кошелева, Н. Г. Невынашивание беременности / Кошелева Н. Г., Плужникова Т. А. // Мир медицины. — 1998. — № 11–12. — С. 43–46.
125. Крамарева, Н. Л. Значение компонентов иммунной системы и генетических факторов в патогенезе и терапии наружного генитального эндометриоза: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2002. — 24 с.
126. Кукес, В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты / Кукес В. Г. — М.: Изд-во Реафарм, 2004. — 144 с.
127. Кукес, В. Г. Клиническая фармакогенетика / Кукес В. Г., Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатьев И. В. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 248 с.
128. Кулинский, В. И. Обезвреживание ксенобиотиков / Кулинский В. И. // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — № 1. — С. 8–12.
129. Лимборская, С. А. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы / Лимборская С. А., Хуснутдинова Э. К., Балановская Е. В. — М.: Наука, 2002. — 281 с.
130. Литвицкий, П. Ф. Изменение количества дифференцировочных молекул лимфоцитов человека при адаптации к неблагоприятным факторам среды и развитии различных форм патологии / Литвицкий П. Ф., Сурнакова Н. Е., Кукес В. Г. // Молекулярная медицина. — 2005. — № 1. — С. 37–45.
131. Лобашев, М. Е. Генетика / Лобашев М. Е. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1969. — 761 с.
132. Мазуров, В. И. Генетика мультифакториальных заболеваний. Диагностическое и прогностическое значение эндогенных факторов риска / Мазуров В. И., Шавловский М. М. // Мед. акад. журнал. — 2006. — Т. 6, № 1. — С. 73–82.
133. Майерс, Р. Обнаружение единичных нуклеотидных замен в ДНК: расщепление РНКазой и денатурирующий градиентный гель-электрофорез / Майерс Р., Шеффилд В., Кокс Д. // Анализ генома: методы. — М.: Мир, 1990. — С. 123–175.
134. Макацария, А. Д. Тромбофилические состояния в акушерской практике / Макацария А. Д., Бицадзе В. О. — М.: Russo, 2001. — 704 с.
135. Макацария, А. Д. Фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. Применение низкомолекулярного гепарина в акушерской, гинекологической и онкологической прак-

- тике / Макацария А. Д., Бицадзе В. О., Акиньшина С. В. // *Consilium-Medicum*. — 2005. — Т. 7, № 7. — С. 556–565.
136. Макацария, А. Д. Антифосфолипидный синдром, генетические тромбофилии в патогенезе основных форм акушерской патологии / Макацария А. Д., Бицадзе В. О. // *РМЖ*. — 2006. — Спец. вып. — С. 2–11.
137. Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы / Колчинский А. М., Грядун Д. А., Лысов Ю. П. [и др.] // *Молекулярная биология*. — 2004. — Т. 38 — С. 5–16.
138. Мищенко, Е. Б. Анализ ассоциации минеральной плотности костной ткани и показателей костного метаболизма с полиморфизмами гена *VDR* у больных остеопорозом и их родственников в Санкт-Петербурге / Мищенко Е. Б., Котова С. М., Санькова Т. П., Дорохов И. И. // *Остеопороз и остеопатии*. — 2005. — № 3. — С. 11–16.
139. Мищенко, Е. Б. Анализ ассоциации минеральной плотности костной ткани и остеопоротических переломов с *COL1A1 Sp1* полиморфизмом у больных остеопорозом и их родственников в Санкт-Петербурге / Мищенко Е. Б., Котова С. М., Санькова Т. П., Дорохов И. И. // *Медицинская генетика*. — 2006. — № 12. — С. 40–44.
140. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / под ред. А. Б. Масленникова. — Новосибирск: Альфа Виста, 2004. — 188 с.
141. Мутации в гене *LRRK2* у больных с болезнью Паркинсона в России / Пчелина С. Е., Иванова О. Н., Емельянов А. К. [и др.] // *Мед. генетика*. — 2006. — Т. 5, прилож. 2. — С. 48–52.
142. Наследственные болезни / Баранов В. С., Горбунова В. Н., Вахарловский В. Г. [и др.] // *Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы)*. Т. 3 / ред. А. И. Карпищенко. — СПб.: Интермедика, 1997. — С. 180–202.
143. Невынашивание беременности: этиопатогенез, диагностика, клиника и лечение: учебное пособие / Кошелева Н. Г., Аржанова О. Н., Плужникова Т. А. [и др.]. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2002. — 70 с.
144. Нефедова, Ю. Б. Молекулярно-генетические механизмы развития артериальной гипертензии / Нефедова Ю. Б., Шварц Е. // *Артериальная гипертензия*. — 1998. — Т. 4, № 1. — С. 63–71.
145. Новиков, П. В. Рахит и наследственные рахитоподобные заболевания у детей / Новиков П. В. — М.: Триада-Х, 2006. — 336 с.
146. Новиков, П. В. Врожденные и наследственные заболевания: руководство по педиатрии / Новиков П. В. — М.: Династия, 2007. — 542 с.
147. Носиков, В. В. Генетика сахарного диабета типа 1 / Носиков В. В. // *Геномика — медицине* / ред. Иванов В. И., Киселев Л. Л. — М.: Академкнига, 2005. — С. 281–311.
148. Носиков, В. В. Молекулярная генетика сахарного диабета 1-го типа: достижения и перспективы / Носиков В. В., Серегин Ю. А. // *Молекулярная биология*. — 2008. — Т. 42, № 5. — С. 867–879.
149. Ноткис, А. Л. Предвестники заболеваний / Ноткис А. Л. // *В мире науки*. — 2007. — № 7. — С. 45–51.
150. Опыт использования биочипов для анализа полиморфных вариантов гена *CYP1A1* при лейкозах у детей / Гра О. А., Глотов А. С., Кожекбаева Ж. М. [и др.] // *Медицинская генетика*. — 2006. — Т. 4, № 46. — С. 34–39.
151. Орлов, А. В. Роль факторов роста в патогенезе неразвивающейся беременности / Орлов А. В., Крукиер И. И., Друккер Н. А., Каушанская Л. В. // *Российский вестник акушера-гинеколога*. — 2005. — № 3. — С. 4–6.

152. Особенности аллельного полиморфизма генов *HLA II* класса (DRB1, DQA1, DQB1) у супругов в парах с невынашиванием беременности / Беспалова О. Н., Бескоровая Т. С., Иващенко И. Н. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2006. — Т. LV, № 3. — С. 5–11.
153. Острый период инфаркта миокарда и генетическая предрасположенность. Сообщение 1: Полиморфизм гена фактора некроза опухолей альфа (*TNFA*) / Плоткин В. Я., Иващенко Т. Э., Воронель В. Л. [и др.] // Вестник СПб. университета. — 2007. — Вып. 3, № 11. — С. 11–21.
154. Пальцев, М. А. Введение в молекулярную медицину / Пальцев М. А. — М.: Медицина, 2004. — 499 с.
155. Патаян, Л. П. Современные представления о механизме регуляции свертывания крови / Папаян Л. П. // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2003. — № 2. — С. 7–11.
156. Пендина, А. А. Метилирование ДНК — универсальный механизм регуляции активности генов / Пендина А. А., Гринкевич В. В., Кузнецова Т. В., Баранов В. С. // Экологическая генетика. — 2004. — № 2 (51). — С. 27–37.
157. Петровский, Ф. И. Цитокины и оксид азота при бронхиальной астме / Петровский Ф. И., Петровская Ю. А., Огородова Л. М., Серебров В. Ю. // Бюллетень сибирской медицины. — 2002. — № 1. — С. 70–74.
158. Плацентарная недостаточность (ПН) и полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз M1, T1 и P1 / Беспалова О. Н., Тарасенко О. А., Малышева О. В. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2006. — Т. LV, № 2. — С. 25–31.
159. Погребенкова, В. В. Анализ востребованности услуг по генетическому тестированию болезней с наследственной предрасположенностью среди населения и врачей г. Томска / Погребенкова В. В., Макеева О. А. // Генетика человека и патология. — Томск, 2007. — С. 103–105.
160. Поиск ассоциации полиморфизма генов *IL4* и *IL4R* с эндометриозом / Козловская М. А., Демин Г. С., Ярмолинская М. И. [и др.] // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, № 4. — С. 48–51.
161. Полиморфизм гена сосудистого рецептора ангиотензина II и сердечно-сосудистые заболевания / Чистяков Д. А. [и др.] // Тер. архив. — 2001. — № 1. — С. 27–30.
162. Полиморфизм генов *CYP2E1*, *CYP2C19*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* в развитии atopической бронхиальной астмы и туберкулеза / Брагина Е. Ю., Фрейдин М. Б., Рудко А. А. [и др.] // Генетика народонаселения и патология: сборник научных трудов. Вып. 8. — Томск, 2007. — С. 55–57.
163. Полиморфизм генов-кандидатов atopической бронхиальной астмы в якутской популяции / Соловьева Н. А., Максимова Н. Р., Николаева Л. Е. [и др.] // Генетика народонаселения и патология: сборник научных трудов. Вып. 8. — Томск, 2007. — С. 122–123.
164. Полиморфные гены липидного обмена, ассоциированные с диабетической нефропатией при сахарном диабете типа 1 / Якунина Н. Ю., Шестакова М. В., Воронько О. Е. [и др.] // Генетика. — 2005. — Т. 41, № 7. — С. 760–765.
165. Полиморфные маркеры I/D и G7831A гена фермента, превращающего ангиотензин I, и гипертрофия миокарда у больных артериальной гипертонией / Бразник В. А. [и др.] // Кардиология. — 2003. — № 2. — С. 44–49.
166. Посисеева, Л. В. Иммунный статус перитонеальной жидкости у женщин с наружным эндометриозом, страдающих бесплодием / Посисеева Л. В., Герасимов А. М., Шор А. Л. // Акуш. и гин. — 2000. — № 6. — С. 27–30.
167. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / ред. Айламазян Э. К., Баранов В. С. — М.: МЕДПресс информ, 2006. — 417 с.

168. Проблемы внедрения достижений геномной медицины в клиническую практику / Минайчева Л. И., Степанов В. А., Пузырев В. П. [и др.] // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 5. — Новосибирск: Альфа Виста, 2004. — С. 115–120.
169. Пузырев, В. П. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека / Пузырев В. П., Фрейдин М. Б., Кучер А. Н. — Томск: Печатная мануфактура, 2007. — 320 с.
170. Пузырев, В. П. Молекулярные основы распространенных мультифакториальных заболеваний / Пузырев В. П., Степанов В. А., Фрейдин М. Б. // Геномика — медицина. — М.: Академкнига, 2005. — С. 100–150.
171. Пузырев, В. П. Генетика артериальной гипертензии (современные исследовательские парадигмы) / Пузырев В. П. // Клиническая медицина. — 2003. — № 1. — С. 12–18.
172. Пузырев, В. П. Геномная медицина — настоящее и будущее / Пузырев В. П. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 3. — Новосибирск: Альфа Виста, 2003. — С. 3–26.
173. Пузырев, В. П. Патологическая анатомия генома человека / Пузырев В. П., Степанов В. А. — Новосибирск: Наука, 1997. — 223 с.
174. Пчелина, С. Н. Болезнь Паркинсона: наследственные формы, молекулярная диагностика / Пчелина С. Н., Иванова О. Н., Якимовский А. Ф., Шварцман А. Л. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 8. / под ред. Масленникова А. Б. — Новосибирск: Альфа Виста, 2006. — С. 39–68.
175. Ранние сроки беременности / ред. Радзинский В. Е., Оразмурад А. А. — М.: МИА, 2005. — 448 с.
176. Ратова, Л. Г. Суточное мониторирование артериального давления в клинической практике / Ратова Л. Г., Дмитриев В. В., Толпыгина С. Н., Чазова И. Е. // *Consilium medicum*. — 2001. — Вып. 2. — С. 3–4.
177. Результаты суточного мониторирования артериального давления у детей и подростков с повышенным уровнем АД, обнаруженным при казуальных измерениях / Образцова Г. И., Черемных Т. В., Ковалев Ю. Р. [и др.] // Артериальная гипертензия. — 2005. — Т. 11, № 1. — URL: http://old.consilium-medicum.com/media/gypur/05_01/55.shtml (дата доступа — 18. 02. 2009).
178. Репина, М. А. Презеклампис и материнская смертность / Репина М. А. — СПб.: СПбМАПО, 2005. — 208 с.
179. Rogozkin, V. A. Генетические маркеры физической работоспособности человека / Rogozkin В. А., Назаров И. Б., Казаков В. И. // Теория и практика физической культуры. — 2000. — № 12. — С. 34–36.
180. Rogozkin, V. A. Гены-маркеры предрасположенности к скоростно-силовым видам спорта / Rogozkin В. А., Астратенкова И. В., Дружевская А. М., Федотовская О. Н. // Теория и практика физической культуры. — 2005. — № 1. — С. 2–4.
181. Роль полиморфизма в промоторной области гена *TNF* в развитии хронической обструктивной болезни легких / Сеитова Г. Н., Букреева Е. Б., Буйкин С. В. [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. — 2004. — № 2. — С. 29–34.
182. Роль полиморфизма гена *p53* в патогенезе эндометриом яичников / Голубева О. В., Иващенко Т. Э., Швед Н. Ю. [и др.] // Ж. акуш. и жен. болезн. — 2007. — Т. LVI, № 2. — С. 53–71.
183. Руководство по безопасному материнству / Кулаков В. И., Серов В. Н., Барашнев Ю. И. [и др.]. — М.: Триада-X, 1998. — 532 с.

184. Руюткина, Л. А. Эволюция принципов лечения сахарного диабета второго типа: от воздействия на симптомы до коррекции их молекулярных механизмов и вторичной сердечно-сосудистой профилактики. Или о механизмах кардиопротекции сахароснижающей терапии / Руюткина Л. А. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. — Новосибирск: Альфа-Виста, 2003. — С. 116–119.
185. Савельева, Г. М. Принципы профилактики и лечения ОПГ-гестозов / Савельева Г. М., Шалина Р. И., Дживелегова Г. Д. // Акуш. и гин. — 1992. — № 3. — С. 14–17.
186. Свердлов, Е. Д. Очерки современной молекулярной генетики по курсу лекций для студентов биологического факультета МГУ. Очерк 6. Генная терапия и медицина XXI века / Свердлов Е. Д. // Мол. генет., микробиол., вирусол. — 1996. — № 4. — С. 3–32.
187. Серебрянский, Ю. Е. Цитокины в иммунореабилитации инфекционных больных / Серебрянский Ю. Е., Афанасьев С. С., Денисов Л. А., Рубальский О. В. // Воен.-мед. журнал. — 1999. — Т. 320, № 3 — С. 41–50.
188. Середенин, С. Б. Лекции по фармакогенетике / Середенин С. Б. — М.: МИА, 2004. — 303 с.
189. Серова, Л. Д. Иммунологический HLA- статус у женщин с привычным невынашиванием беременности: методические рекомендации / Серова Л. Д. — М., 1998.
190. Сидельникова, В. М. Привычная потеря беременности / Сидельникова В. М. — М.: Триада-Х, 2005. — 308 с.
191. Сингер, М. Гены и геномы / Сингер М., Берг П. Т. 1. — М.: Мир, 1998. — 373 с.
192. Синклер, Д. Г. Секрет генов долголетия / Синклер Д. Г., Гайренте Л. // В мире науки. — 2006. — № 6. — С. 23–29.
193. Сироткина, О. В. Молекулярные основы развития тромбозов и подбора анти-тромбических препаратов / Сироткина О. В. // Мед. генетика. — 2006. — Т. 5, Прилож. 2. — С. 29–33.
194. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации / Глотов А. С., Наседкина Т. В., Иващенко Т. Э. [и др.] // Молекулярная биология. — 2005. — Т. 39, № 3. — С. 403–412.
195. Сотникова, Н. Ю. Параметры функционального состояния лимфоцитов перитонеальной жидкости у женщин с наружным генитальным эндометриозом / Сотникова Н. Ю., Анциферова Ю. С., Посисеева Л. В. // Иммунология. — 2000. — № 3. — С. 53–56.
196. Старцева, Н. В. Дифференцированная терапия больных эндометриозом с учетом клинико- гормонально-иммунологических аспектов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1994.
197. Старцева Н. В. Эндометриоз как новая болезнь цивилизации // Вопросы патогенеза, диагностики и лечения. — Пермь, 1997. — 182 с.
198. Старцева, Н. В. Иммунные механизмы возникновения и развития генитального эндометриоза / Старцева Н. В. // Акуш. и гин. — 1983. — № 12. — С. 44–46.
199. Степаненко, И. Л. Регуляция генных сетей стрессового ответа активными формами кислорода / Степаненко И. Л. // Экол. генетика. — 2004. — Т. 2, № 1. — С. 4–12.
200. Стрекалов, Д. Л. Молекулярные основы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний: учебное пособие / Стрекалов Д. Л. — СПб., 2004. — 20 с.
201. Стрижаков, А. Н. Новые подходы к патогенезу, диагностике и лечению различных форм генитального эндометриоза / Стрижаков А. Н., Давыдов А. А. // Пути развития совр. гинекологии: тез. докл. — М., 1995. — С. 149.
202. Стрижаков, А. Н. Эндометриоз. Клинические и теоретические аспекты / Стрижаков А. Н., Давыдов А. И. — М.: Медицина, 1996. — 184 с.

203. Супрун, Л. Я. Эндометриоз: патогенез, лечение / Супрун Л. Я. — Минск: Беларусь, 1987. — 125 с.
204. Сычев, Д. А. Клиническая фармакогенетика / Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатьев И. В., Кулес В. Г. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 245 с.
205. Титович, Е. В. Маркеры разрушения β -клеток на этапах развития сахарного диабета типа 1 / Титович Е. В., Кураева Т. Л. // Сахарный диабет. — 2002. — № 2 (15). — С. 18–22.
206. Тромбофилия в акушерской практике: учебно-методическое пособие / Зайнулина М. С., Корнюшина Е. А., Мозговая М. Л. [и др.]; ред. Айламазян Э. К., Петрищев Н. Н. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2005. — 46 с.
207. Федосеев, Г. Б. Бронхиальная астма / Федосеев Г. Б., Трофимов В. И. — СПб.: Нормедиздат, 2006. — 308 с.
208. Федотовская, О. Н. Влияние C34T полиморфизма в гене АМФ-деаминазы (AMPD1) на физическую работоспособность человека / Федотовская О. Н. // Генетические, психофизические и педагогические технологии подготовки спортсменов: сб. науч. тр. — СПб., 2006. — С. 74–80.
209. Фогель, Ф. Генетика человека / Фогель Ф., Мотульский А. Т. 1 — М.: Мир, 1989. — 306 с.
210. Хавинсон, В. Х. Пептидная регуляция генома и старение / Хавинсон В. Х., Анисимов С. В., Малинин В. В., Анисимов В. Н. — М.: Изд-во РАМН, 2005. — 207 с.
211. Харрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика / Харрингтон С., Макги Дж. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
212. Хуснутдинова, Э. К. Молекулярная этногенетика народов волго-уральского региона / Хуснутдинова Э. К. — Уфа, 1999. — 237 с.
213. Цвелев, Ю. В. Перекисное окисление липидов в патогенезе эндометриоза яичников / Цвелев Ю. В., Пазычев А. А. // Вестник Росс. асс. акуш.-гинеко. — 1998. — № 2. — С. 26–31.
214. Черч, Дж. Проект «Персональный геном» / Черч Дж. // В мире науки. — 2006. — № 4. — С. 30–39.
215. Шадрина, М. И. Молекулярная генетика болезни Паркинсона / Шадрина М. И., Сломинский П. А. // Генетика. — 2006. — № 9. — С. 450–459.
216. Шварцман, А. Л. Болезнь Альцгеймера и современные подходы к ее коррекции / Шварцман А. Л. // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 8./ ред. Масленников А. Б. — Новосибирск: Альфа-Виста, 2005. — С. 29–38.
217. Швед, Н. Ю. Роль генов «внешней среды» в патогенезе и лечении эндометриоза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2006. — 18 с.
218. Швед, Н. Ю. Роль полиморфизма гена микросомальной эпоксидгидролазы (mEPHX1) в патогенезе и лечении наружного генитального эндометриоза / Швед Н. Ю., Ярмолинская М. И., Иващенко Т. Э., Баранов В. С. // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, № 4. — С. 42–47.
219. Шихова, Ю. В. Анализ полиморфизма гена рецептора андрогена у спортсменов / Шихова Ю. В., Ахметов И. И., Астратенкова И. В. // Инновации в науке, образовании и производстве: труды СПбГТУ № 497. — СПб., 2006. — С. 138–142.
220. Шляхто, Е. В. Роль генетических факторов в ремоделировании сердечно-сосудистой системы при гипертонической болезни / Шляхто Е. В., Конради А. О. // Артериальная гипертензия. — 2002. — Т. 4, № 3. — URL: http://old.consilium-medicum.com/media/gyper/02_03/107.shtml (дата доступа — 05. 04. 2009).

221. Эндотелиальная дисфункция при гестозе. Патогенез, генетическая предрасположенность, диагностика и профилактика: методические рекомендации / Мозговая Е. В., Малышева О. В., Иващенко Т. Э. [и др.]. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2003. — 32 с.
222. Якунина, Н. Ю. Исследование ассоциации ряда генов-кандидатов с диабетической полинейропатией у пациентов с сахарным диабетом типа 1: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2006. — 22 с.
223. Янковский, Н. К. Молекулярно-генетические методы в руках детектива, или опыт исследования останков семьи последнего российского императора / Янковский Н. К. // Сорос. образоват. журнал. — 1996. — № 2. — С. 21–27.
224. Ярилин, А. А. Основы иммунологии / Ярилин А. А. — М.: Медицина, 1999. — 608 с.
225. Ярмолинская, М. И. Роль антипролиферативных компонентов иммунной системы в патогенезе и выборе терапии наружного генитального эндометриоза: Автореф. дис.... канд. мед. наук. — СПб., 1997. — 21 с.
226. 1166 A/C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and the response to short-term infusion of angiotensin II / Hilgers K. F., Langenfeld M. R., Schlaich M. [et al.] // Circulation. — 1999. — Vol. 100, N 13. — P. 1394–1399.
227. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase / Frosst P., Blom H. J., Milos R. [et al.] // Nat. Genet. — 1995. — Vol. 10, N 1. — P. 111–113.
228. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality / Mann V., Hobson E. E., Li B. [et al.] // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 107, N 7. — P. 899–907.
229. A Common Mutation (G-455→A) in the β -Fibrinogen Promoter is an Independent Predictor of Plasma Fibrinogen, but not of Ischemic Heart Disease / Tybjærg-Hansen A., Agerholm-Larsen B., Humphries S. E. [et al.] // J. Clin. Invest. — 1997. — Vol. 99, N 12. — P. 3034–3039.
230. A draft annotation and overview of the human genome / Wright F. A., Lemon W. J., Zhao W. D. [et al.] // Genome Biol. — 2001. — Vol. 2, N 7. — P. 25–47.
231. A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response / Liljedahl U., Karlsson J., Melhus H. [et al.] // Pharmacogenetics. — 2003. — Vol. 13, N 1. — P. 7–17.
232. A molecular variant of angiotensinogen is associated with idiopathic intrauterine growth restriction / Zhang X. Q., Yarnar M., Dizon-Townson D. [et al.] // Obstet. Gynecol. — 2003. — Vol. 101, N 2. — P. 237–242.
233. A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: the possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women / Dohi Y., Iki M., Ohgushi H. [et al.] // J. Bone Miner. Res. — 1998. — Vol. 13. — P. 1633–1639.
234. A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia / Zusterzeel P. L., Peters W. H., Visser W. [et al.] // J. Med. Genet. — 2001. — Vol. 38, N 4. — P. 234–237.
235. A polymorphism of the *CC16* gene is associated with an increased risk of asthma / Laing I. A., Goldblatt J., Eber E. [et al.] // J. Mod. Genet. — 1998. — Vol. 35. — P. 463–467.
236. A potential link between muscle peroxisome proliferator-activated receptor- α signaling and obesity-related diabetes / Finck B. N., Bernal-Mizrachi C., Han D. H. [et al.] // Cell Metab. — 2005. — Vol. 1. — P. 133–144.
237. A proposed classification of pelvic endometriosis / Acosta A. A., Buttram V. C. Jr., Besch P. K. [et al.] // Obstet. Gynecol. — 1973. — Vol. 42, N 1. — P. 19–25.

238. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage / Kruse C., Steffensen R., Varming K. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2004. — Vol. 19, N 5. — P. 1215–1221.
239. A third approach to gene prediction suggests thousands of additionally transcribed regions / Glusman G., Qin S., El-Gewely M. R. [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* — 2006. — Vol. 2, N 3. — P. E 18.
240. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: Effect on protein activity and relation to BMD in Japanese women / Arai H., Miyamoto K. I., Taketani Y. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 1997. — Vol. 12. — P. 915–921.
241. A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) and ambulatory blood pressure: the Ohasama Study / Kikuya M., Sugimoto K., Katsuya T. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 2003. — Vol. 26, N 2. — P. 141–145.
242. Abbas, A. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions / Abbas A., Tripathi P., Naik S., Agrawal S. // *European Journal of Immunogenetics.* — 2004. — Vol. 31. — P. 275–278.
243. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA / Bauer S., Groh V., Wu J. [et al.] // *Science.* — 1999. — Vol. 28. — P. 727–729.
244. ADAM33 haplotypes are associated with asthma in a large Australian population / Kedda M.-L., Duffy D. L., Bradley B. [et al.] // *Europ. J. Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 14. — P. 1027–1036.
245. Adiponectin gene haplotype is associated with preeclampsia / Saarela T., Hiltunen M., Helisalmi S. [et al.] // *Genet Test.* — 2006. — Vol. 10, N. 1. — P. 35–39.
246. Ahmad, U. Strong association of a renin intronic dimorphism with essential hypertension / Ahmad U., Saleheen D., Bokhari A., Frossard P. M. // *Hypertens. Res.* — 2005. — Vol. 28, N 4. — P. 339–344.
247. Akhmedova (Pchelina), S. Paraoxonase 1 Met-Leu 54 polymorphism is associated with Parkinson's disease / Akhmedova (Pchelina) S., Yakimovsky A., Schwartz E. // *J. Neurol. Sci.* — 2001. — Vol. 184. — P. 179–182.
248. Alfirevic, Z. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications / Alfirevic Z., Mousa H. A., Martlew V. // *Obstet. Gynecol.* — 2001. — Vol. 97, N 5, Pt. 1. — P. 753–759.
249. Al-Hijji, J. Nitric oxide synthase activity in humtrophoblast, term placenta and pregnant myometrium / Al-Hijji J., Andolf E., Laurini R., Batra S. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2003. — Vol. 1. — P. 51–53.
250. Allelic variants of human calcitonin receptor in the Japanese population / Nakamura M., Zhang Z. Q., Shan L. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 99, N1. — P. 38–41.
251. Altered progesterone /estrogen receptor ratios in endometriosis. A comparative study of steroid receptors and morphology in endometriosis and endometrium / Lyndrup J., Thorpe S., Glenthoj A. [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 1987. — Vol. 66, N 7. — P. 625–629.
252. Altman, R. B. Challenges for biomedical informatics and pharmacogenomics / Altman R. B., Klein T. E. // *Ann. Rev. Toxicol. Pharmacol.* — 2001. — Vol. 42. — P. 113–133.
253. Alving, K. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics / Alving K., Weitzberg E., Lundberg J. M. // *Eur. Respir. J.* — 1993. — Vol. 6. — P. 1368–1370.
254. Ames, B. N. Enzyme lose binding affinity (increased Km)for coenzymes and substrates with age: a strategy for remediation / Ames B. N., Suh J. H., Liu J. // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience, A. John Wiley Sons, 2006. — P. 277–294.

255. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis / Newton C. R., Summers C., Schwarz M. J. [et al.] // *Lancet*. — 1989. — Vol. 30. — P. 1481–1482.
256. An alternative fast and convenient genotyping method for the screening of angiotensin converting enzyme gene polymorphisms / Tanaka C., Kamide K., Takiuchi S. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 2003. — Vol. 26, N 4. — P. 301–306.
257. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α expression in muscle / Handschin C., Rhee J., Lin J. [et al.] // *PNAS*. — 2003. — Vol. 100, N 12. — P. 7111–7116.
258. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia / Tempfer C. B., Dorman K., Deter R. L. [et al.] // *Hypertens Pregnancy*. — 2001. — Vol. 20, N 1. — P. 107–118.
259. An insertion /deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels / Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1990. — Vol. 86, N 4. — P. 1343–1346.
260. An MboI two-allele polymorphism may implicate the human renin gene in primary hypertension / Frossard P. M., Lestrinant G. G., Elshahat Y. I. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 1998. — Vol. 21, N 3. — P. 221–225.
261. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise / Mahoney D. J., Parise G., Melov S. [et al.] // *FASEB J.* — 2005. — Vol. 19. — P. 1498–1500.
262. Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions / Pauer H. U., Voigt-Tschirschwitz T., Hinney B. [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 2003. — Vol. 82, N 10. — P. 942–947.
263. *Anderson, G. G.* Recent advances in the genetics of allergy and asthma / Anderson G. G., Cookson W. O. // *Mol. Med. Today*. — 1999. — Vol. 5. — P. 264–273.
264. Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction / Arbustini E., Grasso M., Fasani R. [et al.] // *Brit. Heart J.* — 1995. — Vol. 74, N 6. — P. 584–591.
265. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A(1166)C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet / Spiering W., Kroon A. A., Fuss-Lejeune M. M. [et al.] // *Hypertension*. — 2000. — Vol. 36, N 3. — P. 411–416.
266. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries / van Geel P. P., Pinto Y. M., Voors A. A. [et al.] // *Hypertension*. — 2000. — Vol. 35, N 3. — P. 717–721.
267. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and cardiovascular phenotypes: the GLAECO and GLAOLD studies / Herrmann S. M., Nicaud V., Schmidt-Petersen K. [et al.] // *Eur. J. Heart. Fail.* — 2002. — Vol. 4, N 6. — P. 707–712.
268. Angiotensin-converting enzyme D/I gene polymorphism and age-related changes in pulse pressure in subjects with hypertension / Safar M. E., Lajemi M., Rudnicki A. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24, N 4. — P. 782–786.
269. Angiotensinogen 235T allele “dosage” is associated with blood pressure phenotypes / Pereira A. C., Mota G. F., Cunha R. S. [et al.] // *Hypertension*. — 2003. — Vol. 41, N 1. — P. 25–30.
270. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension: interaction with ACE gene I allele / Tsai C. T., Fallin D., Chiang F. T. [et al.] // *Hypertension*. — 2003. — Vol. 41, N 1. — P. 9–15.

271. Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss / Salamone L. M., Cauley J. A., Zmuda J. [et al.] // *J. Bone. Miner. Res.* — 2000. — Vol. 15. — P. 308–314.
272. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations / Eiken H. G., Odland E., Boman H. [et al.] // *Nucleic Acids. Res.* — 1991. — Vol. 19, N 7. — P. 1427–1430.
273. Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus / Kaput J., Noble J., Hatipoglu B. [et al.] // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Diseases.* — 2007. — Vol. 17. — P. 89–103.
274. *Arias, F.* Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse — pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta / Arias F., Romero R., Joist H., Kraus F. T. // *J. Matern. Fetal. Med.* — 1998. — Vol. 7. — P. 277–286.
275. *Arking, E. B.* Association between functional variants of the KLOTHO gene and high density lipoprotein cholesterol, blood pressure, smoke and longevity / Arking E. B. // *Circ. Rec.* — 2005. — Vol. 96. — P. 412.
276. Aromatase and endometriosis / Bulun S. E., Fang Z., Imir G. [et al.] // *Semin. Reprod. Med.* — 2004. — Vol. 22, N 1. — P. 45–50.
277. Aromatase as a therapeutic target in endometriosis / Bulun S. E., Zeitoun K. M., Takayama K. [et al.] // *Trends Endocrinol Metab.* — 2000. — Vol. 11, N1. — P. 22–27.
278. Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in Connexin 26 (GJB2) / Lin D., Goldstein J. A., Mhatre A. N. [et al.] // *Hum. Mutat.* — 2001. — Vol. 18. — P. 42–51.
279. Association analysis of nine missense polymorphisms in the coagulation factor V gene with severe preeclampsia in pregnant Japanese women / Watanabe H., Hamada H., Yamada N. [et al.] // *J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 47, N 3. — P. 131–135.
280. Association and linkage of juvenile MS with HLA-DR(15) in Russians / Boiki A. N., Gusev E. I., Sudomoina M. A. [et al.] // *Neurology.* — 2002. — Vol. 58. — P. 658–660.
281. Association between a beta2-adrenergic receptor polymorphism and elite endurance performance / Wolfarth B., Rankinen T., Mühlbauer S. [et al.] // *Metabolism.* — 2007. — Vol. 56, N 12. — P. 1649–1651.
282. Association between endometriosis and N-acetyl transferase 2 polymorphisms in a UK population / Nakago S., Hadfield R. M., Zondervan K. T. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 7, N 11. — P. 1079–1083.
283. Association between gene mutation of cytochrome P450 1A1 in exon 7 A4889G locus and susceptibility to endometriosis / Peng D. X., He Y. L., Qiu L. W. [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* — 2003. — Vol. 20, N 4. — P. 284–286.
284. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density / Rosen C. J., Kurland E. S., Vereault D. [et al.] // *J. of Clin. Endocrinol. and Metabolism.* — 1998. — Vol. 83. — P. 2286–2290.
285. Association between the transmembrane region polymorphism of MHC class I chain related gene-A and type 1 diabetes mellitus in Sweden / Gupta M., Nikitina-Zake L., Zarghami M. [et al.] // *Human Immunology.* — 2003. — Vol. 64. — P. 553–561.
286. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk / van Meurs J. B., Schuit S. C., Weel A. E. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 2003. — Vol. 12, N 14. — P. 1745–1754.
287. Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension / Jin J. J., Nakura J., Wu Z. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 2003. — Vol. 26, N 7. — P. 547–552.

288. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? / Couto E., Barini R., Zaccaria R. [et al.] // *Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 45. — P. 138–141.
289. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese / Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T. [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* — 1998. — Vol. 28. — P. 449–453.
290. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene / Kobayashi S., Inoue S., Hosoi T. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 1996. — Vol. 11. — P. 306–311.
291. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis / Sano M., Inoue S., Hosoi T. [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 1995. — Vol. 217. — P. 378–383.
292. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis / Georgiou I., Syrou M., Bouba I. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1999. — Vol. 72, N 1. — P. 164–166.
293. Association of HLA-DQB1 coding with unexplained recurrent spontaneous abortions / Wang X. P., Lin Q. D., Lu P. H. [et al.] // *Chin. Med. J.* — 2004. — Vol. 117. — P. 492–497.
294. Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes / Gambelunghe G., Ghaderi M., Cosentino A. [et al.] // *Diabetologia.* — 2000. — Vol. 43. — P. 507–514.
295. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone / Albagha O. M., Pettersson U., Stewart A. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 2005. — Vol. 42, N 3. — P. 240–246.
296. Association of polymorphisms of the renin-angiotensin system and bradykinin B2 receptor with ACE-inhibitor-related cough / Mukae S., Itoh S., Aoki S. [et al.] // *J. Hum. Hypertens.* — 2002. — Vol. 16, N 12. — P. 857–863.
297. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions / Schweikert A., Rau T., Berkholz A. [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2004. — Vol. 113, N 1. — P. 67–72.
298. Association of some vascular genetic markers with different forms of preeclampsia / Demin G. S., Ivashchenko T. E., Mozhovaia H. V. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 13, N 1. — P. 331–332.
299. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness / Van Eerdewegh P., Little R. D., Dupuis J. [et al.] // *Nature.* — 2002. — Vol. 418. — P. 426–430.
300. Association of the CTLA-4 gene 49 AG polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children / Mochizuki M., Amemiya S., Kobayashi K. [et al.] // *Diabetes Care.* — 2003. — Vol. 26. — P. 843–847.
301. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women / Kado N., Kitawaki J., Obayashi H. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17, N 4. — P. 897–902.
302. Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions / Yan W. H., Lin A., Chen X. J. [et al.] // *Tissue Antigens.* — 2006. — Vol. 68, N 6. — P. 521–523.
303. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia / Yoshimura T., Yoshimura M., Tabata A. [et al.] // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2000. — Vol. 7, N 4. — P. 238–241.
304. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE / Shin H. D., Park B. L., Kim L. H. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 2004. — Vol. 13, N 4. — P. 397–403.

305. Association study of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene G2350A dimorphism with myocardial infarction / Iqbal M. P., Mahmood S., Mehboobali N. [et al.] // *Exp. Mol. Med.* — 2004. — Vol. 36, N 2. — P. 110–115.
306. Associations between hypertension and genes in the renin-angiotensin system / Zhu X., Chang Y. P., Yan D. [et al.] // *Hypertension.* — 2003. — Vol. 41, N 5. — P. 1027–1034.
307. AT1 and AT2 angiotensin receptor gene expression in human heart failure / Haywood G. A., Gullestad L., Katsuya T. [et al.] // *Circulation.* — 1997. — Vol. 95, N 5. — P. 1201–1206.
308. Audi, L. Genetic determinants of bone mass / Audi L., Garcia-Ramirez M., Carrascoso A. // *Horm. Res.* — 1999. — Vol. 51, N 3. — P. 105–123.
309. Austin, M. A. Genebanks: A comparison of eight proposed international genetic databases / Austin M. A., Harding S., McEhoy C. // *Community Genet.* — 2003. — Vol. 6. — P. 37–45.
310. Bachmann, S. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function / Bachmann S., Mundel P. // *Am. J. Kidney Dis.* — 1994. — Vol. 24, N 1. — P. 112–129.
311. Bao, S. Brain nitric oxide synthase expression is enhanced in the human cervix in labor / Bao S., Rai J., Schreiber J. // *J. Soc. Gynecol. Invest.* — 2001. — Vol. 8. — P. 158–164.
312. Bao, S. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human pregnant myometrium at term / Bao S., Rai J., Schreiber J. // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2002. — Vol. 9, N 6. — P. 351–356.
313. Baranov, V. S. Genetic polymorphisms of detoxification genes as basic predictive markers of aging / Baranov V. S., Glotov O. S. // *Antiaging Med. World Congress, Paris, 2006, March 23–25.* — Paris, 2006. — P. 116.
314. Baranova, H. Genomics and personalised prevention programmes and long way ahead. A brief overview / Baranova H. // *J. Europ. Antiaging Med.* — 2005. — Vol. 1. — P. 16–18.
315. Baranova, H. Nos gènes, notre santé et nous / Baranova H. — N. Y.: Armand Colin., 2004. — 216 p.
316. Barber, J. C. K. Chromosomal copy number variation / Barber J. C. K. // *E. C. A. Newsletter.* — 2008. — Vol. 22. — P. 6–14.
317. Barish, G. D. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome / Barish G. D., Narkar V. A., Evans R. M. // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116, N 3. — P. 590–597.
318. Barnes, P. J. Nitric oxide and asthmatic inflammation / Barnes P. J., Liew F. Y. // *Immunol. Today.* — 1995. — Vol. 16. — P. 128–130.
319. Barnoy, S. Genetic testing for late-onset diseases: effect of disease controllability, test predictivity, and gender on the decision to take the test / Barnoy S. // *Genetic testing.* — 2007. — Vol. 11, N 2. — P. 187–193.
320. Barroso, I. Genetics of type 2 diabetes / Barroso I. // *Diabet. Med.* — 2005. — Vol. 22, N 5. — P. 517–535.
321. Bartosik, D. Endometrial tissue in peritoneal fluid / Bartosik D., Jacobs S. L., Kelly L. J. // *Fertil. Steril.* — 1986. — Vol. 46, N 5 — P. 796–800.
322. Baudet, A. L. The ad hoc Committee on Mutation Nomenclature. 1996. Update of nomenclature for human gene mutations / Baudet A. L. // *Hum. Mutat.* — 1996. — Vol. 8. — P. 197–202.
323. Baudin, B. New aspects on angiotensin converting enzyme: from gene to disease / Baudin B. // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2002. — Vol. 40. — P. 256–265.
324. Baxter, S. W. GSTM1 null polymorphism and susceptibility to endometriosis and ovarian cancer / Baxter S. W., Thomas E. J., Campbell I. G. // *Carcinogenesis.* — 2001. — Vol. 22, N1. — P. 63–65.
325. Bdolah, Y. Recent advances in understanding of preeclampsia / Bdolah Y., Karumanchi S. A., Sachs B. P. // *Croat. Med. J.* — 2005. — Vol. 46, N 5. — P. 728–736.

326. *Beck, S.* The human epigenome project / Beck S. // *Europ. J. Hum. Genet.* — 2007. — Suppl. 1. — P. 47. C67. — (ESHG Conference:Nice Abstracts, 2007).
327. *Beer, A. E.* Reproductive medicine program Finch University of Health Science / Beer A. E., Kwak J. ; Chicago Medical School. — Chicago, 2000. — 96 p.
328. *Beery, T. A.* Risk reduction and health promotion behaviors following genetic testing for adult-onset disorders / Beery T. A., Williams J. K. // *Genetic Testing.* — 2007. — Vol. 11, N 2. — P. 111–117.
329. Beijing Atherosclerosis Study. Angiotensin II type I receptor gene and myocardial infarction: tagging SNPs and haplotype based association study. The Beijing atherosclerosis study / Su S., Chen J., Zhao J. [et al.] // *Pharmacogenetics.* — 2004. — Vol. 14, N 10. — P. 673–681.
330. *Benetos, A.* Aortic collagen, aortic stiffness, and AT1 receptors in experimental and human hypertension / Benetos A., Safar M. E. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 74, N 7. — P. 862–866.
331. *Bennett, S.* Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus / Bennett S., Lucassen A., Gough S. // *Nature Genetics.* — 1995. — Vol. 9. — P. 284–292.
332. *Berry, T. A.* Risk reduction and health promotion behaviors following genetic testing for adult-onset disorders / Berry T. A., Williams J. K. // *Genetic Testing.* — 2007. — Vol. 11, N 2. — P. 111–117.
333. *Bjorksten, B.* The environment and sensitisation to allergens in early childhood / Bjorksten B. // *Pediatr. Allergy. Immunol.* — 1997. — Vol. 8. — P. 32–39.
334. *Boden, G.* Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM / Boden G. // *Diabetes.* — 1997. — Vol. 46. — P. 3–10.
335. *Bolding, D. J.* A tutorial on statistical methods for population association studies *Nature Reviews* / Bolding D. J. // *Genetics.* — 2006. — Vol. 36 — P. 7781–7791.
336. Bone mineral density and five prominent candidate genes in Chinese men: associations, interaction effects and their implications / Leia, Yuan-Yuan Zhangb, Fei-Yan Deng a [et al.] // *Maturitas.* — 2005. — Vol. 51. — P. 199–206.
337. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus / Hustmyer F. G., Peacock M., Hui S. [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1994. — Vol. 94, N 5. — P. 2130–2134.
338. *Bouchie, A. A.* Genomics payoff? Is diagnostic the best for the companies such as Celera that once put its money on drug development / Bouchie A. A. // *The Scientist.* — 2006. — Vol. 20, N 4. — P. 78.
339. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance / Williams A. G., Dhamrait S. S., Wootton P. T. [et al.] // *J. Appl. Physiol.* — 2004. — Vol. 96, N 3. — P. 938–942.
340. *Brand, A.* The impact of genetics and genomics on public health / Brand A., Brand H., Baumen T. S. // *Europ. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 16. — P. 5–13.
341. *Braverman, E.* Age Print for Anti-Ageing Medicine / Braverman E. // *J. Europ. Antiaging Med.* — 2005. — Vol. 1. — P. 7–8.
342. *Brennan, R. O.* Nutrigenetics. New concepts for relieving hypoglycemia / Brennan R. O. — N. Y.: M. Evans Co. Inc., 1975. — 217 p.
343. *Brockmoller, J.* Combined analysis of inherited polymorphisms in arilamine N-acetyltransferase-2, glutathione-S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk / Brockmoller J., Cascorbi I., Kerb R. // *Cancer Res.* — 1996. — Vol. 56. — P. 3915–3925.

344. *Burke, W.* Moving beyond ACCE: expanded framework for genetic test evaluation. September 2007 / Burke W., Zimmern R. L. — URL: www.phgfoundation.org. (дата доступа — 14. 01. 2009).
345. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? / Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 98. — P. 357–360.
346. Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in postmenopausal women / Taboulet J., Frenkian M., Frendo J. L. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7, N 13. — P. 2129–2133.
347. Capacity building of the transfer of the genetic/genomic knowledge into practice and prevention: the CAPABILITY international collaborative network / Nippert I., Krisoffersson U., Schmidtko J. [et al.] // *Europ. J. Human Genetics.* — 2008. — Vol. 16, Suppl. 2. — P. 421.
348. *Caput, J.* Nutritional Genomics. Discovering the path to personalized nutrition / Caput J., Rodriguez R. L. — N. Y.: Wiley-Interscience, 2006. — 467 p.
349. *Carreiras, M.* Preeclampsia: a multifactorial disease resulting from the interaction of the feto-maternal HLA genotype and HCMV infection / Carreiras M., Montagnani S., Layrisse Z. // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2002. — Vol. 48, N 3. — P. 176–183.
350. *Case-Green, S. C.* Analysing genetic information with DNA arrays / Case-Green S. C., Mir K. U., Pritchard C. E., Southern E. M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 1998. — Vol. 2. — P. 404–410.
351. *Chappell, S.* Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia / Chappell S., Morgan L. // *Clin. Sci.* — 2006. — Vol. 110, N 4. — P. 443–458.
352. *Chesley, L. C.* Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women / Chesley L. C., Cooper D. W. // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* — 1986. — Vol. 93, N 9. — P. 898–908.
353. *Chew, C. H.* Molecular characterisation of six alternatively spliced variants and a novel promoter in human peroxisome proliferator-activated receptor alpha / Chew C. H., Samian M. R., Najimudin N., Tengku-Muhammad T. S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — Vol. 305, N 2. — P. 235–243.
354. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk / Ambrosone C. B., Freudenheim J. L., Graham S. [et al.] // *JAMA.* — 1996. — Vol. 13, N 276(18). — P. 1494–1501.
355. Circulating angiotensin converting enzyme activity is correlated with muscle strength / Williams A. G., Day S. H., Folland J. P. [et al.] // *Med. Sci. Sports Exerc.* — 2005. — Vol. 37, N 6. — P. 944–948.
356. Clinical screening of gene rearrangements in childhood leukemia using a multiplex PCR-microarray approach / Nasedkina T. V., Zharinov V. S., Isaeva E. A. [et al.] // *Clinical Cancer Research.* — 2003. — Vol. 9, N 15. — P. 5620–5629.
357. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease / Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E. W. [et al.] // *Neuron.* — 2004. — Vol. 44. — P. 595–600.
358. *COL1A1* Sp1 polymorphism predicts perimenopausal and early postmenopausal spinal bone loss / McDonald H. M., McGuigan F. A., New S. A. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2001. — Vol. 16, N 9. — P. 1634–1641.
359. *Colhoun, H. M.* Problems of reporting genetic association with complex outcome / Colhoun H. M., McKeigue, Smith G. D. // *Lancet.* — 2003. — Vol. 361. — P. 865–871.
360. *Collins, F. S.* Implication of Human Genome Project for Medical Science / Collins F. S., McKusick V. A. // *JAMA.* — 2001. — Vol. 285, N 5. — P. 540–544.
361. *Collins, F. S.* Shattuck Lecture Medical and Societal Consequences of the Human Genome Project / Collins F. S. // *New Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 341, N 1. — P. 28–37.

362. *Combs, C. A.* Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys / Combs C. A., Katz M. A., Kitzmiller J. L., Brescia R. J. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1993. — Vol. 169, N 1. — P. 215–223.
363. Concordance for Type 1 Diabetes in Identical Twins Is Affected by Insulin Genotype / Metcalfe K. A., Hitman G. A., Rowe R. E. [et al.] // *Diabetes Care.* — 2001. — Vol. 24, N 5. — P. 838–842.
364. *Connor, S. T.* Genetic breakthrough that reveals the differences between humans Independent / science ed. Connor S. T., 2006. — URL: http://news.independent.co.uk/world/science_technology/article2007490.ece. (дата доступа — 14. 01. 2009).
365. *Constans, A.* A practical guide to the HapMap / Constans A. // *The Scientist.* — 2007. — Vol. 20, N 2. — P. 68.
366. *Constans, A.* Making Medicine Personal / Constans A. // *The Scientist.* — 2005. — Vol. 16, N 19. — P. 7–14.
367. *Cookson W. O. C.* Genetic of asthma and allergic disease / Cookson W. O. C., Moffat M. F. // *Hum. Mol. Gene.* — 2000. — Vol. 9, N 16. — P. 2359–2364.
368. *Copper, G. S.* Are vitamin D receptor Polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis / Copper G. S., Umbach D. M. // *J. Bone Miner Res.* — 1996. — Vol. 11. — P. 1841–1849.
369. *Cotton, R. G. H.* Proof of “Disease causing” mutations / Cotton R. G. H., Scriver C. R. // *Hum. Mut.* — 1998. — Vol. 12. — P. 1–3.
370. *Cotton, R. G. H.* Locus-specific databases: from ethical principles to practice / Cotton R. G. H., Sallee C. L., Knoppers B. M. // *Hum. Mut.* — 2005. — Vol. 26, N 5. — P. 489–493.
371. *Cotton, R. G. H.* Towards the human variom project / Cotton R. G. H., Kazazian H. H. // *Hum. Mutat.* — 2005. — Vol. 26, N 6. — P. 499.
372. *Coulam, C. B.* Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage / Coulam C. B., Jeyendran R. S., Fishel L. A., Roussev R. // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2006. — Vol. 55, N 5. — P. 360–368.
373. *Cross, J. C.* Transcription Factors Underlying the Development and Endocrine Functions of the Placenta / Cross J. C., Anson-Cartwright L., Scott C. // *Recent Progress in Hormone Research.* — 2002. — Vol. 57. — P. 221–234.
374. Cross-sectional study of low back pain among workers at an industrial enterprise in Russia / Toroptysova N. V., Benevolenskaya L. I., Karyakin A. N. [et al.] // *Spine.* — 1998. — Vol. 20, N 3. — P. 328–332.
375. *Cunningham, D. S.* Changes in T-cell regulation of responses to self antigens in women with pelvic endometriosis / Cunningham D. S., Hansen K. A., Coddington C. C. // *Fertil. Steril.* — 1992. — Vol. 58, N 1. — P. 114–119.
376. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis / Mitsuyasu H., Yanagihara Y., Mao X. Q. [et al.] // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 162. — P. 1227–1231.
377. *CYP19* gene polymorphism in endometrial cancer patients / Berstein L. M., Imyanitov E. N., Susptsin E. N. [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 2001. — Vol. 127, N 2. — P. 135–138.
378. *CYP11A1, CYP19, and GSTM1* polymorphisms increase the risk of endometriosis / Arvanitis D. A., Koumantakis G. E., Goumenou A. G. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2003. — Vol. 79. — P. 702–709.
379. Cytochrome P450c17alpha 5'-untranslated region *T/C polymorphism in endometriosis / Hsieh Y. Y., Chang C. C., Tsai F. J. [et al.] // *J. Genet.* — 2004. — Vol. 83, N 2. — P. 189–192.

380. *Daher, S.* Cytokine genotyping in preeclampsia / Daher S., Sass N., Oliveira L. G., Matar R. // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2006. — Vol. 55, N 2. — P. 130–135.
381. *Dausset, J.* Genetic paves the way for a new predictive approach of medicine / Dausset J., Blanche H., Cohen N. // *Proc. Indiannatn. Sci. Acad.* — 1994. — Vol. B60, N 5. — P. 449–454.
382. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol / Zeitoun K., Takayama K., Sasano H. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1998. — Vol. 83, N 12. — P. 4474–4480.
383. *Dekker, G. A.* Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts / Dekker G. A., Sibai B. M. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1998. — Vol. 179, N 5. — P. 1359–1375.
384. *Desvergne, W. W.* Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism / Desvergne, W. Wahli // *Endocr. Rev.* — 1999. — Vol. 20. — P. 649–688.
385. Detection of CFTR mutations using ARMS and low-density microarrays / Eaker S., Johnson M., Jenkins J. [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* — 2005. — Vol. 15, N 21. — P. 933–999.
386. Detection of insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in preeclampsia / Zhou N., Yu P., Chen J. [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* — 1999. — Vol. 16, N 1. — P. 29–31.
387. Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays / Huber M., Losert D., Hiller R. [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2001. — Vol. 299, N1. — P. 24–30.
388. Determinants of bone mineral density in postmenopausal white Iowans / Willing M. C., Torner J. C., Burns T. L. [et al.] // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* — 1998. — Vol. 52, N 6. — P. 337–342.
389. *Diment, D. A.* Genetics of multiple sclerosis / Diment D. A., Ebers G. C., Sadovnick A. D. // *Lancet Neurol.* — 2004. — Vol. 3. — P. 104–110.
390. *Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006.
391. Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre-eclampsia: a British multicenter candidate-gene study // *Am. J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 77, N 1. — P. 127–131.
392. *DiZerega, C. S.* Endometriosis: Role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression / DiZerega C. S., Barber D. L., Hodgen G. D. // *Fertil. Steril.* — 1980. — Vol. 35. — P. 521–525.
393. *Ebert, A. D.* Aromatase inhibitors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in endometriosis: new questions—old answers? / Ebert A. D., Bartley J., David M. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2005. — Vol. 122, N 2. — P. 144–150.
394. *Echeverri, Ch. J.* High-throughput RNA screening in cultured cells: a users guide / Echeverri Ch. J., Perrimon S. // *Nature Rev.* — 2006. — Vol. 7. — P. 373–384.
395. Effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on pregnancy outcome, enzyme activity, and zinc concentration / Tamura T., Johanning G. L., Goldenberg R. L. [et al.] // *Obstet. Gynecol.* — 1996. — Vol. 88, N 4. — P. 497–502.
396. Effects of ACE I/D and AT1R-A1166C polymorphisms on blood pressure in a healthy normotensive primary care population: first results of the Hippocrates study / Henskens L. H., Spiering W., Stoffers H. E. [et al.] // *J. Hypertens.* — 2003. — Vol. 21, N 1. — P. 81–86.
397. Effects of the *ADH3*, *CYP2E1*, and *GSTP1* genetic polymorphisms on their expressions in Caucasian lung tissue / Yang M., Coles B. F., Delongchamp R. [et al.] // *Lung Cancer.* — 2002. — Vol. 38, N 1. — P. 15–21.

398. *Efstathiadou, Z.* Association of collagen Ialpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis / Efstathiadou Z., Tsatsoulis A., Ioannidis J. P. // *J. Bone. Miner. Res.* — 2001. — Vol. 16, N 9. — P. 1586–1592.
399. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease / Kitawaki J., Kado N., Ishihara H. [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 83, N 1–5. — P. 149–155.
400. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage / Tempfer C., Unfried G., Zeillinger R. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 16, N 8. — P. 1644–1647.
401. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study / Serrano N. C., Casas J. P., Diaz L. A. [et al.] // *Hypertension.* — 2004. — Vol. 44, N 5. — P. 702–707.
402. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- α in skeletal muscle / Russell A. P., Feilchenfeldt J., Schreiber S. [et al.] // *Diabetes.* — 2003. — Vol. 52. — P. 2874–2881.
403. *Engel, S. M.* Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth / Engel S. M., Olshan A. F., Siega-Riz A. M. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2006. — Vol. 195, N 5. — P. 1231.
404. Epidemiology of health changes in older women in Hong Kong / Ho S. C., Woo J., Yuen Y. K. [et al.] // *Asia Pac. J. Public Health.* — 2000. — Vol. 12, Suppl. — P. S28–33.
405. ER-alpha Genetics Meta-Analysis. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis / Ioannidis J. P., Stavrou I., Trikalinos T. A. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2002. — Vol. 17, N 11. — P. 2048–2060.
406. ESHG Conference 2007 // *European J. Hum. Genet.* — 2007. — Vol. 15, Suppl.
407. Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene / Procopciuc L., Popescu T., Jebeleanu G. [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* — 2002. — Vol. 6, N 2. — P. 245–250.
408. Estrogen production and metabolism in endometriosis / Bulun S. E., Yang S., Fang Z. [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 955. — P. 75–88.
409. Estrogen receptor alpha dinucleotide repeat and cytochrome P450c17alpha gene polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis / Hsieh Y. Y., Chang C. C., Tsai F. J. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2005. — Vol. 83, N 3. — P. 567–572.
410. Estrogen receptor gene polymorphisms are associated with recurrence of endometriosis / Luisi S., Galleri L., Marini F. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2006. — Vol. 85, N 3. — P. 764–766.
411. Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause / Weel A. E., Uitterlinden A. G., Westendorp I. C. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1999. — Vol. 84, N 9. — P. 3146–3150.
412. Ethnic difference in contribution of Sp1 site variation of COL1A1 gene in genetic predisposition to osteoporosis / Nakajima T., Ota N., Shirai Y. [et al.] // *Calcif Tissue Int.* — 1999. — Vol. 65, N 5. — P. 352–353.
413. EUROGAPP Project. / *Population Genetics Screening Programs: Principles, Techniques, Practices and Policies.* — 2000. — 65 p.
414. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis / Kovalevsky G., Gracia R., Berlin J. [et al.] // *Arch. Intern. Med.* — 2004. — Vol. 164, N 5. — P. 558–563.

415. *Evans, W. E.* Pharmacogenomics: the inherited basis for individual differences in drug response / Evans W. E., Johnson J. A. // *Ann. Rev. in Genet. Human Genomics.* — 2001. — Vol. 2. — P. 9–39.
416. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study / O'Donnell C. J., Lindpaintner K., Larson M. G. [et al.] // *Circulation.* — 1998. — Vol. 97, N 18. — P. 1766–1772.
417. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women / Becherini L., Gennari L., Masi L. [et al.] // *Human Molecular Genetics.* — 2000. — Vol. 9. — P. 2043–2050.
418. Exhaled Nitric Oxide in patients with asthma association with *NOS1* genotype / Wechsler M. E., Grasemann H., Deykin A. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. — Vol. 162. — P. 2043–2047.
419. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) in human placenta / Rossmanith W., Hoffmeister U., Wolfahrt S. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 5. — P. 487–494.
420. Factor V Leiden and factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome / Benedetto C., Marozio L., Salton L. [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* — 2002. — Vol. 81, N. 12. — P. 1095–1100.
421. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate-reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages / Foka Z. J., Lambropoulos A. F., Saravelos H. [et al.] // *Human Reproduction.* — 2000. — Vol. 15, N 2. — P. 458–462.
422. Factor V Leiden, C > T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia / Grandone E., Margaglione M., Colaizzo D. [et al.] // *Thromb. Haemost.* — 1997. — Vol. 77, N 6. — P. 1052–1054.
423. Factors in childhood as predictors of asthma in adult life / Jenkins M. A., Hopper J. L., Bowes G. [et al.] // *BMJ.* — 1994. — Vol. 309. — P. 90–93.
424. Factors modifying the risk of IDDM in offspring of an IDDM parent / Elhashimy M., Angelico M. C., Martin B. C. [et al.] // *Diabetes.* — 1995. — Vol. 44. — P. 295–299.
425. *Fields, Ch.* How many genes in the human genome? / Fields Ch., Adams M. D., White O., Venter J. Cr. // *Nature Genet.* — 1994. — Vol. 7. — P. 345–346.
426. *Finck, B. N.* PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease / Finck B. N., Kelly D. P. // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116. — P. 615–622.
427. *Fisher, S. J.* The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia / Fisher S. J. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 2. — P. 53.
428. Flavell Peroxisome proliferator-activated receptor α gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension / Jamshidi Y., Montgomery H. E., Hense H-W. [et al.] // *Circulation.* — 2002. — Vol. 105. — P. 950–955.
429. *Fodde, R.* Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) / Fodde R., Losekoot M. // *Hum. Mutat.* — 1994. — Vol. 3, N 2. — P. 83–94.
430. *Fogelman, I.* Gonadotropin-releasing hormone agonists and the skeleton / Fogelman I. // *Fertil. Steril.* — 1992. — Vol. 57. — P. 715–724.
431. Fok I polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and osteoporotic fracture in early postmenopausal women / Gennari L., Becherini L. [et al.] // *Bone.* — 1998. — Vol. 23, N5, Suppl. — P. S373.

432. *Foster, W. G.* Environmental contaminants and dietary factors in endometriosis / Foster W. G., Agarwal S. K. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 955. — P. 213–232.
433. *Fraser, S.* Ten years of life: is it the matter of choice? / Fraser S., Slavik V. // *Arch. Intern. Med.* — 2001. — Vol. 217. — P. 113–117.
434. Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: Genotype-Phenotype correlation / Diego C. D., Alcantara M., Valle J. [et al.] // *Genet. Testing.* — 2006. — Vol. 10, N 3. — P. 178–185.
435. *Frossard, P. M.* Human renin gene BgII dimorphism associated with hypertension in two independent populations / Frossard P. M., Lestringant G. G., Malloy M. J., Kane J. P. // *Clin. Genet.* — 1999. — Vol. 56, N 6. — P. 428–433.
436. *Furness P.* The evaluation of diagnostic laboratory tests and complex biomarkers. Summary of a Diagnostic Summit 14–15 January 2008 / Furness P., Zimmern R. L., Wright C., Adams M. // *www.phgfoundation.org* March 2008. (дата доступа — 14. 01. 2009).
437. *Furuya, Y.* Vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese patients with prostate cancer / Furuya Y., Akakura K., Masai M., Ito H. // *Endocr. J.* — 1999. — Vol. 46, N 3. — P. 467–470.
438. Gene expression profiling of human placentas from preeclamptic and normotensive pregnancies / Hansson S. R., Chen Y., Brodzski J. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2006. — Vol. 12, N 3. — P. 169–179.
439. Gene-gene interaction in the RAS system in the predisposition to myocardial infarction in elder population of St. Petersburg (Russia) / Fomicheva E. V., Gukova S. P., Larionova-Vasina V. I. [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* — 2000. — Vol. 69, N 1. — P. 76–80.
440. Genes, development and evolution of the placenta / Cross J. C., Baczyk D., Dobric N. [et al.] // *Placenta.* — 2003. — Vol. 24, N 2–3. — P. 123–130.
441. Genetic and environmental determinants of peak bone mass in young men and women / McGuigan F. E., Murray L., Gallagher A. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2002. — Vol. 17, N 7. — P. 1273–1279.
442. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population / Arngrimsson R., Bjornsson S., Geirsson R. T. [et al.] // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* — 1990. — Vol. 97, N 9. — P. 762–769.
443. Genetic approaches to Noncommunicable Diseases / eds. Berg K., Bulyjenkov V., Christen Y. — N. Y.: Springer-Verlag, 1996.
444. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels / Wang X. L., Mahaney M. C., Sim A. S. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1997. — Vol. 17, N 11. — P. 3147–3153.
445. Genetic contribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene promoter (–1031, –863 and –857) and TNF receptor 2 gene polymorphisms in endometriosis susceptibility / Teramoto M., Kitawaki J., Koshiba H. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2004. — Vol. 51, N 5. — P. 352–357.
446. Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage / Yamada H., Sata F., Saijo Y. [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* — 2005. — Vol. 31, N 3. — P. 334–345.
447. Genetic influence on bone turnover in postmenopausal twins / Garner P., Arden N. K., Griffiths G., Delmas P. D., Spector T. D. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1996. — Vol. 81, N 1. — P. 140–146.
448. Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels / Sowers M., Willing M., Burns T. [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research.* — 1999. — Vol. 14. — P. 1411–1419.

449. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects / Christensen B., Arbour L., Tran P. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 84. — P. 151–155.
450. Genetic polymorphisms in the Renin-Angiotensin system in high-altitude and low-altitude Native American populations / Rupert J. L., Kidd K. K., Norman L. E. [et al.] // *Ann. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 67, Pt. 1. — P. 17–25.
451. Genetic screening for two LRRK2 mutations in french patients with idiopathic Parkinson's disease / Funalot B., Nichols W., Perez-Tur J. [et al.] // *Genet. Testing.* — 2006. — Vol. 10, N 4. — P. 290–297.
452. Genetic structure of human populations / Rosenberg N. A., Pitchani J. K., Weber J. L. [et al.] // *Science.* — 2002. — Vol. 298. — P. 2381–2385.
453. Genetic tests for common diseases: new insights, old concerns / Meltzer D., Hogarth St., Liddel K. [et al.] // *Brit. Med. J.* — 2008. — Vol. 336. — P. 590–593.
454. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension / Jones A., Dhamrait S. S., Payne J. R. [et al.] // *Hypertension.* — 2003. — Vol. 42, N 4. — P. 500–506.
455. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma / Moffatt M. F., Kabisch M., Liang L. [et al.] // *Nature.* — 2007. — Vol. 10. — P. 1038.
456. Genetic variation at the human tissue-type plasminogen activator (tPA) locus: haplotypes and analysis of association to plasma levels of tPA / Ladenvall P., Nilsson S., Jood K. [et al.] // *European Journal of Human Genetics.* — 2003. — Vol. 11. — P. 603–610.
457. Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance / Alvarez R., Terrados N., Ortolano R. [et al.] // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2000. — Vol. 82, N1–2. — P. 117–120.
458. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINs? / Lattuada D., Somigliana E., Viganò P. [et al.] // *Clin. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 61, N 2. — P. 190–194.
459. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms / Genari L., Becherini L., Falchetti A. [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 81, N 1. — P. 1–24.
460. Genistein and polyphenols in the study of cancer prevention: chemistry, biology, statistics and experimental design / Barnes St., Allison D. B., Page G. P. [et al.] // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. Kaput J., Rodriguez R. L. — N. Y.: Wiley-Interscience, 2006. — P. 305–330
461. Genomewide Linkage Analysis of Weight Change in the Framingham Heart Study / Fox C. S., Heard-Costa N. L., Vasan R. S. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2005. — Vol. 15. — P. 3197–3201.
462. Genomics and World Health: Report of WHO scientific group HLB: OZ 50. — Geneva, 2002. — 125 p.
463. Genotype and allele frequency of PAI-1 promoter polymorphism in healthy subjects from the west of Mexico. Association with biochemical and hematological parameters / Ruiz-Quezada S., Vazquez-Del Mercado M., Parra-Rojas I. [et al.] // *Ann Genet.* — 2004. — Vol. 47, N 2. — P. 155–162.
464. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in european populations / Estivill H., Bancells C., Ramos C. [et al.] // *Human Mutation.* — 1997. — Vol. 10. — P. 135–154.
465. Gerhardt, A. Maternal IVS1–401 T allele of the estrogen receptor alpha is an independent predictor of late fetal loss / Gerhardt A., Scharf R., Mikat-Drozdzyński B. // *Fertil. Steril.* — 2006. — Vol. 86, N 2. — P. 448–453.

466. Gerold, D. DNA chips: promising toys have become powerful tools / Gerold D., Rushmore T., Caskey C. T. // Trends. Biochem. Sci. — 1999. — Vol. 24. — P. 168–173.
467. Gibson, U. E. A novel method for real time quantitative RT-PCR / Gibson U. E., Heid C. A., Williams P. M. // Genome. Res. — 1996. — Vol. 6, N 10. — P. 995–1001.
468. Gilsanz, V. Importance of technique for determination of phenotype / Gilsanz V. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1999. — Vol. 84, N 11. — P. 4294–4295.
469. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss / Sata F., Yamada H., Kondo T. [et al.] // Mol. Hum. Reprod. — 2003. — Vol. 9, N 3. — P. 165–169.
470. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population / Baranova H., Bothorishvilli R., Canis M. [et al.] // Mol. Hum. Reprod. — 1997. — Vol. 3, N 9. — P. 775–780.
471. Golubovsky, M. Genome organization and three kind of heritable changes: general description and stochastic factors / Golubovsky M., Manton K. G. // Frontiers in Bioscience. — 2005. — Vol. 10. — P. 335–344.
472. Goodfellow, C. F. Maternal lymphocyte responses during normal and abnormal pregnancies, measured in vitro using composite trophoblast antigens and phytohaemagglutinin / Goodfellow C. F. // Immunol. Rev. — 1983. — Vol. 75. — P. 61–85.
473. Goodman, C. S. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? / Goodman C. S., Coulam C. B., Jeyendran R. S. // Am. J. Reprod. Immunol. — 2006. — Vol. 56, N 4. — P. 230–236.
474. Greenblatt, M. S. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis / Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., Harris C. C. // Cancer Res. — 1994. — Vol. 54, N 18. — P. 4855–4878.
475. Greesaman, B. J. Haplotype-based identification of microsomal transfer protein marker associated with the human lifespan / Greesaman B. J. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2003. — Vol. 100. — P. 14115–14120.
476. Gross, M. Clinical heterogeneity and molecular mechanisms in inborn muscle AMP deaminase deficiency / Gross M. // J. Inherit. Metab. Dis. — 1997. — Vol. 20. — P. 186–192.
477. Grossman, T. Latest advances in antiaging medicine / Grossman T. // Keio J. Med. — 2005. — Vol. 54. — P. 85–94.
478. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and their relationship with advanced stages of endometriosis in South Indian women / Babu K. A., Reddy N. G., Deendayal M. [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. — 2005. — Vol. 15, N 3. — P. 167–172.
479. Guo, Sh. Green tea polyphenoles and cancer prevention / Guo Sh., Sonenshein G. // Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition / eds. Kaput J., Rodriguez R. L. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006. — P. 255–276.
480. Guo, S. W. The association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving dioxin detoxification enzymes: a systematic review / Guo S. W. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. — 2006. — Vol. 124, N 2. — P. 134–143.
481. Haddad, E. K. Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells / Haddad E. K., Duclos A. J., Baines M. G. // J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 182. — P. 1143–1151.
482. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter / Stevens A., Soden J., Brenchley P. E. [et al.] // Cancer Research. — 2003. — Vol. 63. — P. 812–816.

483. *Harrison, G. A.* A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene / Harrison G. A., Humphrey K. E., Jakobsen I. B., Cooper D. W. // *Hum. Mol. Genet.* — 1993. — Vol. 2, N 12. — P. 2200.
484. *Hassett, C.* Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants / Hassett C., Aicher L., Sidhu J. S., Omiecinski C. J. // *Hum. Mol. Genet.* — 1994. — Vol. 3, N 3. — P. 421–428.
485. *Hayes, J. D.* Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences / Hayes J. D., Strange R. C. // *Pharmacology.* — 2000. — Vol. 61, N 3. — P. 154–166.
486. *Heid, C. A.* Real time quantitative PCR / Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. // *Genome. Res.* — 1996. — Vol. 6, N10. — P. 986–994.
487. *Hekimi, S.* Genetics and specificity of aging process / Hekimi S., Guarente L. // *Science.* — 2003. — Vol. 299. — P. 1353–1354.
488. *Henry* Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action / Loviscach M., Rehman N., Carter L. [et al.] // *Diabetologia.* — 2000. — Vol. 43, N 3. — P. 304–311.
489. *Herrera, B. M.* Progress in deciphering the genetics of multiple sclerosis / Herrera B. M., Ebers G. C. // *Curr. Opin. Neurol.* — 2003. — Vol. 16. — P. 253–258.
490. *HLA-A-A*24-B*07-DRB1*01 haplotype implicated with genetic disposition of peak bone mass in healthy young Japanese women* / Tsuji S., Munkhbat B., Hagiwara M. [et al.] // *Hum. Immunol.* — 1998. — Vol. 59. — P. 243–249.
491. *HLA-DQA1, DQB1 genotypes and islet cell antibodies in predictive tests for identification of at risk siblings in IDDM families* / Glotov O. S., Glazkov P. B., Vartonayan N. L. [et al.] // *International Congress in Predictive Medicine, France. 29 June–1 July 2001.* — Vichy, 2001.
492. *Hobson, E.* Functional effects of a polymorphism of collagen (I) alpha 1 gene (CollA1) in osteoporosis / Hobson E., Dean V., Grant S. F. A., Ralston S. H. // *J. Med. Genet.* — 1998. — Vol. 35, Suppl. — P. 32.
493. *Holla, L. I.* Association study of promoter polymorphisms within the *NOS3* gene and allergic diseases / Holla L. I., Stejskalova A., Znojil V., Vasku A. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2006. — Vol. 141, N 2. — P. 103–109.
494. *Holmes, Z. R.* The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss / Holmes Z. R., Regan L., Chilleot I., Cohen H. // *Br. J. Haematol.* — 1999. — Vol. 105, N 1. — P. 98–101.
495. *Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C* / Undas A., Williams E. B., Butenas S. [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 4389–4397.
496. *Hosagrahara, V. P.* Functional analysis of human microsomal epoxide hydrolase genetic variants / Hosagrahara V. P., Rettie A. E., Hassett C., Omiecinski C. J. // *Chem. Biol. Interact.* — 2004. — Vol. 150, N 2. — P. 149–159.
497. *Hubert, C.* Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene / Hubert C., Houot A. M., Corvol P., Soubrier F. // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266, N 23. — P. 15377–15383.
498. *Human gene for physical performance* / Montgomery H. E., Marshall R., Hemingway H. [et al.] // *Nature.* — 1998. — Vol. 21. — P. 221–222.
499. *Human-chimpanzee DNA sequence variation in the four major genes of the renin-angiotensin system* / Dufour C., Casane D., Denton D. [et al.] // *Genomics.* — 2000. — Vol. 69, N 1. — P. 14–26.
500. *Human-lineage specific amplification, Selection and Neuronal Expression of DUF1220* / Popescu M. C., MacLaren E. J., Hopkins J. [et al.] // *Science.* — 2006. — Vol. 313. — P. 1304–1307.

501. *Humphries, A. W.* Arteriosclerotic abdominal aortic aneurysms / Humphries A. W., De-wolfe V. G., Lafevre F. A., Britton R. C. // *Postgrad. Med.* — 1960. — Vol. 28. — P. 236–241.
502. *Humphries, S. E.* Genetic testing for cardiovascular disease susceptibility: Clinical management tool or possible misinformation? / Humphries S. E., Ridker P. M., Talmud P. J. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 628–636.
503. *Hur, S. E.* Polymorphisms of the genes encoding the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* in Korean women: no association with endometriosis / Hur S. E., Lee J. Y., Moon H. S., Chung H. W. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2005. — Vol. 11, N 1. — P. 15–19.
504. *Hviid, T. V.* HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels / Hviid T. V., Hylenius S., Rorbye C., Nielsen L. G. // *Immunogenetics.* — 2003. — Vol. 55, N 2. — P. 63–79.
505. *Hviid, T. V.* Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G—possible implications for human reproduction and autoimmune disease / Hviid T. V., Christiansen O. B. // *Hum. Immunol.* — 2005. — Vol. 66, N 6. — P. 688–699.
506. *Hylenius, S.* Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads / Hylenius S., Andersen A. M., Melbye M., Hviid T. V. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2004. — Vol. 10, N 4. — P. 237–246.
507. Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruption placentae / Steegers-Theunissen R. P., Boers G. H., Blom H. J. [et al.] // *Lancet.* — 1992. — Vol. 339. — P. 1122–1123.
508. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss / Wouters M. G., Boers G. H., Blom H. J. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1993. — Vol. 60. — P. 820–825.
509. Hypertension, serum angiotensinogen, and molecular variants of the angiotensinogen gene among / Rotimi C., Cooper R., Ogunbiyi O. [et al.] // *Nigerians. Circulation.* — 1997. — Vol. 95. — P. 2348–2350.
510. Immunogenetic aspects of preeclampsia / Bolis P. F., Martinetti Bianchi M., La Fianza A. [et al.] // *Biol. Res. Pregnancy Perinatol.* — 1987. — Vol. 8, N 1. — P. 42–45.
511. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis / Oosterlynck D. J., Meuleman C., Waer M. [et al.] // *Obstet. Gynecol.* — 1993. — Vol. 82. — P. 206–212.
512. Importance of genetic factors in adolescent asthma: a population-based twin-family study / Laitinen T., Rasanen M., Kaprio J. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 157. — P. 1073–1078.
513. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide / Karvonen M., Viik-Kajander M., Moltchanova E. [et al.] // *Diabetes Care.* — 2000. — Vol. 23. — P. 1516–1526.
514. Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma / Foley S. C., Mogas A. K., Olivenstein R. [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2007. — Vol. 119, N 4. — P. 863–871.
515. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos / Zetterberg H., Regland B., Palmer M. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 10. — P. 113–118.
516. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy / Kupferminc M. J., Eldor A., Steinman N. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 340, N 1. — P. 9–13.
517. Influence of vitamin receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women; a twin study in Britain / Spector T. D., Keen R. W., Arden N. K. [et al.] // *BMJ.* — 1995. — Vol. 310, N 6991. — P. 1357–1360.

518. Intense exercise causes decrease in expression of both endothelial NO synthase and tissue NOx level in hearts / Iemitsu M., Miyauchi T., Maeda S. [et al.] // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* — 2000. — Vol. 279. — P. 951–959.
519. Interaction between vitamin D receptor genotype and estrogen receptor alpha genotype influences vertebral fracture risk / Colin E. M., Uitterlinden A. G., Meurs J. B. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2003. — Vol. 88, N 8. — P. 3777–3784.
520. Interleukin-18 (interferon-g-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-g to inhibit osteoclast formation / Udagawa N., Horwood N. J., Elliott J. [et al.] // *J. Experimental Medicine.* — 1997. — Vol. 185. — P. 1005–1012.
521. International HapMap Consortium A haplotype map of the human genome // *Nature.* — 2005. — Vol. 437. — P. 1299–1317.
522. Intrauterine Growth Restriction in Humans Is Associated with Abnormalities in Placental Insulin-Like Growth Factor Signaling / Laviola L., Perrini S., Belsanti G. [et al.] // *Endocrinology.* — 2004. — Vol. 146, N 3. — P. 1498–1505.
523. Ioannidis, J. P. Replication validity of genetic association studies / Ioannidis J. P., Ntzani E. E., Trikalinos T. A., Contopoulos-Ioannidis D. G. // *Nat. Genet.* — 2001. — Vol. 29. — P. 306–309.
524. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones / Celeste A. J., Rosen V., Buecker J. L. [et al.] // *EMBO J.* — 1986. — Vol. 5, N 8. — P. 1885–1890.
525. Isotalo, P. A. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations / Isotalo P. A., Wells G. A., Donnelly J. G. // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67. — P. 986–990.
526. Ivaschenko, T. E. Glutathione-S-transferase micro and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma / Ivaschenko T. E., Sideleva O. G., Baranov V. S. // *J. Mol. Med.* — 2002. — Vol. 80, N 1. — P. 39–43.
527. Janssen, J. A. Role of polymorphisms in the IGF-1 gene in aging and age-related diseases / Janssen J. A. // *Anti-Aging World Conference: abstr.*, march 10–12, 2005. — Monte-Carlo, 2005. — P. 116–117.
528. Jones, A. Skeletal muscle RAS and exercise performance / Jones A., Woods D. R. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 2003. — Vol. 35, N 6. — P. 855–866.
529. Kaiser, T. Association of the TNF2 allele with eclampsia / Kaiser T., Grehan M., Brennecke S. P., Moses E. K. // *Gynecol. Obstet. Invest.* — 2004. — Vol. 57, N 4. — P. 204–209.
530. Kalow, W. Pharmacogenetics: Heredity and Response to Drugs / Kalow W. — Philadelphia: W. B. Saunders. — Philadelphia, London, 1962.
531. Kanasaki, P. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyestradiol is associated with pre-eclampsia / Kanasaki P., Kalluri R. // *Nature.* — 2008. — Vol. 10. — P. 1038.
532. Kaput, J. Nutritional genomics: The next frontier in the postgenomic era / Kaput J., Rodriguez R. L. // *Physiol. genomics.* — 2004. — Vol. 16. — P. 166–177.
533. Kaput, J. Introduction and overview of nutritional genomics: application to type 2 diabetes and international nutrigenomics / Kaput J. // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y., 2006. — P. 1–27.
534. Katz, V. L. Recurrent miscarriage / Katz V. L., Kuller J. A. // *Am. J. Perinatol.* — 1994. — Vol. 11. — P. 386–397.
535. Kaufmann, P. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia / Kaufmann P., Black S., Huppertz B. // *Biology of Reproduction.* — 2003. — Vol. 69. — P. 1–7.

536. *Kazzi, S. N.* Polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and risk and severity of bronchopulmonary dysplasia among very low birth weight infants / Kazzi S. N., Kim U. O., Quasney M. W., Buhimschi I. // *Pediatrics*. — 2004. — Vol. 114, N2. — P. 243–248.
537. *Kenealy, S. J.* The genetic epidemiology of multiple sclerosis / Kenealy S. J., Pericak-Vance M. A., Haines J. L. // *J. Neuroimmunol.* — 2003. — Vol. 143. — P. 7–12.
538. *Khan, S.* Hereditary thrombophilia / Khan S., Dickerman J. D. // *Thrombosis Journal*. — 2006. — Vol. 4. — P. 234–236.
539. *Khavinson, V. Kh.* Gerontological aspects of genome peptide regulation / Khavinson V. Kh., Malinin V. V. [et al.] — Basel: Karger, 2005. — 104 p.
540. *Kilpatrick, D. C.* Association between susceptibility to pre-eclampsia within families and HLA DR4 / Kilpatrick D. C., Liston W. A., Gibson F., Livingstone J. // *Lancet*. — 1989. — Vol. 2, N 8671. — P. 1063–1065.
541. *Klatz, R.* The anti-ageing medicine, the world's fastest growing medical speciality / Klatz R. // *J. Europ. Antiaging Med.* — 2005. — Vol. 1. — P. 10–12.
542. *Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women* / Kawano K. J., Ogata N., Chiano M. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2002. — Vol. 17. — P. 1744–1751.
543. *Kolchinsky, A.* Analysis of SNPs and other genomic variations using gel-based chips / Kolchinsky A., Mirzabekov A. // *Hum. Mutat.* — 2002. — Vol. 19, N 4. — P. 343–360.
544. *Koninckx, P. R.* Is mild endometriosis a disease? Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? / Koninckx P. R. // *Hum. Reprod.* — 1994. — Vol. 9. — P. 2202–2205.
545. *Kotulak, R.* Why do people get sick? Science close to answer / Kotulak R. // *The Scientist*. — 2005. — Vol. 20. — P. 37.
546. *Kraus, R. M.* Dietary and genetic effects on atherogenic dyslipidemia / Kraus R. M., Siri P. W. // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006. — P. 295–304.
547. *Krawczak, M.* Mutation process in pathology and evolution / Krawczak M., Cooper D. N. // *Human Genome Evolution* / eds. E. Jackson, T. Strachan, G. Dover. — N. Y.: Bios Scient. Publ., 1996. — P. 1–34.
548. *Kruse, S.* Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor α produced by alternative splicing / Kruse S., Forster J., Kuehr J., Deichmann K. A. // *Internat. Immunol.* — 1999. — Vol. 11, N 12. — P. 1965–1969.
549. *Kutteh, W. H.* Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss / Kutteh W. H., Park V. M., Deitcher S. R. // *Fertil. Steril.* — 1999. — Vol. 71, N 6. — P. 1048–1053.
550. *Kyvik, K. O.* Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins / Kyvik K. O., Green A., Beck-Nielsen H. // *BMJ*. — 1995. — Vol. 311(7010). — P. 913–917.
551. *Lack of an intronic Sp1 binding-site polymorphism at the collagen type I alpha1 gene in healthy Korean women* / Han K. O., Moon I. G., Hwang C. S. [et al.] // *Bone*. — 1999. — Vol. 24, N 2. — P. 135–137.
552. *Lack of association between endometriosis and N-acetyl transferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in a Japanese population* / Deguchi M., Yoshida S., Kennedy S. [et al.] // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2005. — Vol. 1, N 3. — P. 208–213.
553. *Lack of association between the HindIII RFLP of the osteocalcin (BGP) gene and bone mineral density (BMD) in healthy pre- and postmenopausal Chinese women* / Mo,

- Chi-Ke Cao, Fu-Hua Xu, Man-Yuan Liu [et al.] // *J. Bone Miner. Metab.* — 2004. — Vol. 22. — P. 264–269.
554. Lack of association between the TGF-beta1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion / Amani D., Dehaghani A., Zolghadri J. [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* — 2005. — Vol. 68, N 1–2. — P. 91–103.
555. Lack of association of Cdx polymorphism with bone mineral density in Korean postmenopausal women / Kim S., Rhee Y., Li S. [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research.* — 2002. — Vol. 17, Suppl. 1. — P. S324.
556. Lack of correlation between Mbo I restriction fragment length polymorphism of renin gene and essential hypertension in Japanese / Fu Y., Katsuya T., Asai T. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 2001. — Vol. 24, N 3. — P. 295–298.
557. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia / Goldman-Wohl D. S., Ariel I., Greenfield C. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 6, N 1. — P. 88–95.
558. *Laird, N. M.* Family based design in the age of large scale gene-association studies / Laird N. M., Lange Chr. // *Nature Rev.* — 2006. — Vol. 7. — P. 385–394.
559. *Landegren, U. N.* Ligation-based DNA diagnosis / Landegren U. N. // *BioAssays.* — 1993. — Vol. 15, N 11. — P. 761–765.
560. *Lander, E. S.* Array of Hope / Lander E. S. // *Nature Genet.* — 1999. — Vol. 21, Suppl. — P. 3–4.
561. *Lane, D. A.* Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease / Lane D. A., Grant P. J. // *Blood.* — 2000. — Vol. 95, N 5. — P. 1517–1532.
562. *Langdahl, B. L.* An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women / Langdahl B. L., Ralston S. H., Grant S. F., Eriksen E. F. // *J. Bone Miner. Res.* — 1998. — Vol. 13, N 9. — P. 1384–1389.
563. *Langdahl, B. L.* Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass bone turnover and osteoporotic fractures / Langdahl B. L., Gravholt C. H., Brixen K., Eriksen E. F. // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 30, N 7. — P. 608–617.
564. *Laurenzana, E. M.* Post-transcriptional regulation of human microsomal epoxide hydrolase / Laurenzana E. M., Hassett C., Omiecinski C. J. // *Pharmacogenetics.* — 1998. — Vol. 8, N 2. — P. 157–167.
565. *Lefkowitz, J.* Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine / Lefkowitz J., Plow E. F., Topol E. J. // *The New England J. Medicine.* — 1995. — Vol. 332, N 23. — P. 1553–1560.
566. *Lerman, L. S.* Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis / Lerman L. S., Silverstein K. // *Methods Enzymol.* — 1987. — Vol. 155. — P. 482–501.
567. *Liden, M.* Polymorphism at the Sp 1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden / Liden M., Wilen B., Ljunghall S., Melhus H. // *Calcif. Tissue Int.* — 1998. — Vol. 63, N 4. — P. 293–295.
568. *Lifton, R. P.* Molecular mechanisms of human hypertension / Lifton R. P., Gharavi A. G., Geller D. S. // *Cell.* — 2001. — Vol. 104, N 4. — P. 545–556.
569. *Lin, J.* Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis / Lin J., August P. // *Obstet. Gynecol.* — 2005. — Vol. 105, N 1. — P. 182–192.
570. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families / Kawashima T., Noguchi E., Arinami T. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 1998. — Vol. 35. — P. 502–504.

571. Linkage of human tumor necrosis factor- α to human osteoporosis by sib pair analysis / Ota N., Hunt S. C., Nakajima T. [et al.] // *Genes Immun.* — 2000. — Vol. 1, N 4. — P. 260–264.
572. Linkage of interleukin 6 locus to human osteopenia by sibling pair analysis / Ota N., Hunt S. C., Nakajima T. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 105, N 3. — P. 253–257.
573. *Lipshutz, R. J.* High density synthetic oligonucleotide arrays / Lipshutz R. J., Fodor S. P., Gingeras T. R., Lockhart D. J. // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 21. — P. 20–24.
574. *Liston, W. A.* Is genetic susceptibility to pre-eclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus? / Liston W. A., Kilpatrick D. C. // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* — 1991. — Vol. 98, N 11. — P. 1079–1086.
575. *Lowenstein, C. J.* Nitric oxide: a physiologic messenger / Lowenstein C. J., Dinerman J. L., Snyder S. H. // *Ann. Intern. Med.* — 1994. — Vol. 120, N 3. — P. 227–237.
576. *Lucentini, J.* Gene association studies typically wrong. Reproducible gene-disease associations are few and far between / Lucentini J. // *The Scientist.* — 2004. — Vol. 18. — P. 24.
577. *Ludwig, H.* Increased susceptibility to endocrine ophthalmopathy in HLA CW3 positive thyrotoxicosis patients [proceedings] / Ludwig H., Schernthaner G., Mayr W. R., Mehdi S. Q. // *Diabete Metab.* — 1976. — Vol. 2, N 3. — P. 163.
578. *Lung, C. C.* Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency / Lung C. C., Chan E. K., Zuraw B. L. // *J. Allergy. Clin. Immunol.* — 1997. — Vol. 99, N 1, Pt. 1. — P. 134–146.
579. *Maher, B.* Is it the code? The debate / Maher B. // *The Scientist.* — 2006. — Vol. 20, N 5. — P. 34.
580. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice / Kregge J. H., John S. W., Langenbach L. L. [et al.] // *Nature.* — 1995. — Vol. 375, N 6527. — P. 146–148.
581. *Martucci, C. P.* P450 enzymes of estrogen metabolism / Martucci C. P., Fishman J. // *Pharmacol. Ther.* — 1993. — Vol. 57, N 2–3. — P. 237–257.
582. *Masharani, U.* MboI RFLP at the human renin (ren) gene locus / Masharani U., Frossard P. M. // *Nucleic. Acids. Res.* — 1988. — Vol. 16, N 5. — P. 2357.
583. *Masud, S.* Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis / Masud S., Ye S. // *J. of Medical Genetics.* — 2003. — Vol. 40. — P. 773–780.
584. Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase / Rigo J. Jr., Nagy B., Fintor L. [et al.] // *Hypertens Pregnancy.* — 2000. — Vol. 19, N 2. — P. 163–172.
585. Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism / Mello G., Parretti E., Gensini F. [et al.] // *Hypertension.* — 2003. — Vol. 41, N 4. — P. 932–937.
586. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis / Bulun S. E., Gurates B., Fang Z. [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* — 2002. — Vol. 55, N1–2. — P. 21–33.
587. *Meinhardt, U.* The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact / Meinhardt U., Mullis P. E. // *Horm. Res.* — 2002. — Vol. 57, N 5–6. — P. 145–152.
588. *Meinhardt, U.* The essential role of the aromatase/p450arom / Meinhardt U., Mullis P. E. // *Semin. Reprod. Med.* — 2002. — Vol. 20, N 3. — P. 277.
589. Meta-analysis of *COL1A1* Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture / Mann V. [et al.] // *Bone.* — 2003. — Vol. 32. — P. 711–717.

590. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study / Thakkestian A., D'Este C., Eisman J. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2004. — Vol. 19, N 3. — P. 419–428.
591. Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes / Barroso I., Luan J., Sandhu M. S. [et al.] // *Diabetologia.* — 2006. — Vol. 49, N 3. — P. 501–505.
592. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations / Garte S., Gaspari L., Alexandrie A. [et al.] // *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.* — 2001. — Vol. 10. — P. 1239–1248.
593. Metabolic gene polymorphisms associated with atopic bronchial asthma / Ivaschenko T. E., Sideleva O. G., Zelenina L. A. [et al.] // *Balkan. J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 4, N 3–4. — P. 23–28.
594. Metabolomics: bringing nutrigenomics to practice in individualized health assessment prevention / German J. B., Dillard C. J., Hillyard S. L. [et al.] // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006. — P. 85–104.
595. Methionine synthase (MTR) 2756(A→G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG / methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three factors for having a child with Down syndrome / Bosco P., Gueant-Rodriguez R. M., Anello G. [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* — 2003. — Vol. 121, N 3. — P. 219–224.
596. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia / Sohda S., Arinami T., Hamada H. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 1997. — Vol. 34, N 6. — P. 525–526.
597. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms in preeclampsia and the HELLP syndrome / Zusterzeel P. L., Visser W., Blom H. J. [et al.] // *Hypertens Pregnancy.* — 2000. — Vol. 19, N 3. — P. 299–307.
598. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours / Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L. [et al.] // *Nature.* — 1992. — Vol. 356 (6366). — P. 215–221.
599. *Michel, F. B.* Prevention of allergy / Michel F. B., Bousquet J. // *Presse Med.* — 1989. — Vol. 16. — P. 1367–1369.
600. *Mikkelsen, T. S.* Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences / Mikkelsen T. S., Wakefield M. J., Aken B. // *Nature.* — 2006. — Vol. 447. — P. 167–177.
601. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays / Pastinen T., Kurg A., Metspalu A. [et al.] // *Genome. Res.* — 1997. — Vol. 7. — P. 606–614.
602. *Moncada, S.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. // *Pharmacol. Rev.* — 1991. — Vol. 43, N 2. — P. 109–142.
603. *Mooney, D. P.* Improved wound healing through the local delivery of tumor necrosis factor / Mooney D. P., Gamelli R. L. and O'Reilly M. // *Surgical Forum.* — 1988. — Vol. 39. — P. 77–79.
604. *Morrison, N. A.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles / Morrison N. A., Qi J. C., Tokita A., Kelly P. J. // *Nature.* — 1994. — Vol. 367. — P. 284–287.
605. *Moser, R.* IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals / Moser R., Fehr J., Bruijnzeel P. L. // *J. Immunol.* — 1992. — Vol. 149. — P. 1432–1438.
606. *Mosselman, J.* Identification and characterization of a novel human estrogen receptor / Mosselman J., Polman R., Dijkema E. R. // *FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 392. — P. 49–53.

607. *Mozgovaia, E. V.* Genetic predisposition to pre-eclampsia: polymorphism of genes involved in regulation of endothelial functions / *Mozgovaia E. V., Malysheva O. V., Ivashchenko T. E., Baranov V. S.* // *BJMG.* — 2002. — Vol. 5, N 3–4. — P. 19–26.
608. *MTHFR C677T Polymorphism and factor V Leiden mutation are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women* / *Kohashi G., Kato E. H., Morikawa M.* [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* — 2005. — Vol. 31, N 3. — P. 266–271.
609. *Multi-locus candidate gene polymorphisms and risk of myocardial infarction: a population-based, prospective genetic analysis* / *Zee R. Y., Cook N. R., Cheng S.* [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* — 2006. — Vol. 4, N 2. — P. 341–348.
610. *Multivariate analysis of genetic and acquired factors; T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia* / *Kobashi G., Shido K., Hata A.* [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* — 2001. — Vol. 27, N 2. — P. 143–147.
611. *Murphy, A. A.* Clinical aspects of endometriosis / *Murphy A. A.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 955. — P. 1–10.
612. *Mutation Analysis of the parkin Gene in Russian Families with Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism* / *Illarishkin S. N., Periquet M., Rawal N.* [et al.] // *Movement Disord.* — 2003. — Vol. 18. — P. 914–919.
613. *Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease* / *Le W. D., Xu P., Jankovic J.* [et al.] // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 33. — P. 85–89.
614. *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism* / *Bonifati V., Rizzu P., van Baren M. J.* [et al.] // *Science.* — 2003. — Vol. 299. — P. 256–259.
615. *Myelin basic protein gene is associated with MS in DR4- and DR5- positive Italians and Russians* / *Guerini F. R., Ferrante P., Locsiale L.* [et al.] // *Neurology.* — 2003. — Vol. 61. — P. 520–526.
616. *Naber, C. K.* Genetics of human arterial hypertension / *Naber C. K., Siffert W.* // *Minerva. Med.* — 2004. — Vol. 95, N 5. — P. 347–356.
617. *Naber, C. K.* Genetics of human coronary vasomotion / *Naber C. K., Siffert W., Erbel R., Heusch G.* // *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* — 2004. — Vol. 97, N 3. — P. 255–260.
618. *Nakaki, T.* Physiological and clinical significance of nitric oxide / *Nakaki T.* // *Keio J. Med.* — 1994. — Vol. 43, N 1. — P. 15–26.
619. *Nathan, C.* Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls / *Nathan C., Xie Q.* // *Cell.* — 1994. — Vol. 79. — P. 915–918.
620. *National Human Genome Research Institute What's next? Turning Genomics Vision Into Reality* April 24, 2003. — URL://www.nhgri.nih.gov. (дата доступа — 14.01.2009).
621. *Nebert, D. W.* Ecogenetics: from biology to health / *Nebert D. W., Carvan M. J.* // *Toxicol. Indust. Hlth.* — 1997. — Vol. 13. — P. 163–192.
622. *Nebert, D. W.* Polymorphisms in drug metabolising enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? / *Nebert D. W.* // *A. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 60. — P. 265–271.
623. *New goals for the US Human Genome Project: 1998–2003* / *Collins F. S., Patrions A., Jordan E.* [et al.] // *Science.* — 1998. — Vol. 282. — P. 682–689.
624. *NIEHS Alphabetic listing of Health Topics “Alzheimer’s Disease and Aluminium”* / <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query?> (дата доступа — 14.01.2009).
625. *Nimer Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping* / *Greene M. E., Blumberg B., McBride O. W.* [et al.] // *Gene Expr.* — 1995. — Vol. 4. — P. 281–299.

626. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions / Forstermann U., Closs E. I., Pollock J. S. [et al.] // *Hypertension*. — 1994. — Vol. 23, N 6. — P. 1121–1131.
627. No association between atopy /asthma and the IL50Val polymorphism of IL-4 receptor / Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1999. — Vol. 160. — P. 342–345.
628. No association of endometriosis with glutathione S-transferase M1 and T1 null mutations in a Japanese population / Morizane M., Yoshida S., Nakago S. [et al.] // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2004. — Vol. 11, N 2. — P. 118–121.
629. No linkage or association of the IL-4Ralpha gene Q576R mutation with atopic asthma in Italian families / Patuzzo C., Trabetti E., Malerba G. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 37. — P. 382–384.
630. *Norman, B.* Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle / Norman B., Mahnke-Zizelman D. K., Vallis A., Sabina R. L. // *J. Appl. Physiol.* — 1998. — Vol. 85. — P. 1273–1278.
631. *North, K.* A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in general population / North K., Nan Yang, Mills M. // *Nature genetics*. — 1999. — Vol. 21. — P. 353–354.
632. Nutrient-gene interaction involving soy peptide and chemopreventive genes in prostate epithelial cells / Magbanua M. J. M., Dawson K., Huang L. [et al.] // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006. — P. 255–276.
633. *Nutrigenetics and Nutrigenomics* / eds. Simopoulos A. P., Ordovas J. M. — N. Y.: Karger, 2004.
634. *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006.
635. *Oefner, P. J.* Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) / Oefner P. J., Underbill P. A. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 57. — P. A266.
636. *Oiso, N.* Interleukin-4 receptor alpha chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan / Oiso N., Fukai K., Ishii M. // *Br. J. Dermatol.* — 2000. — Vol. 142. — P. 1003–1006.
637. *Olshansky, S. J.* Future. The Longevity dividend / Olshansky S. J. // *The Scientist*. — 2006. — Vol. 20. — P. 28–37.
638. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) / Hamosh A., Scott A. F., Amberger J. [et al.] // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 15. — P. 57–61.
639. *Oosterlynck, D. J.* Lymphokine-activated killer activity in women with endometriosis / Oosterlynck D. J., Lacquet F. A., Waer M., Koninckx P. R. // *Gynecol. Obstet. Invest.* — 1994. — Vol. 37, N 3. — P. 185–190.
640. *Ordovas, J. M.* Gene-diet interaction and plasma lipid responses to dietary intervention / Ordovas J. M. // *Biochem. Soc. Trans.* — 2002. — Vol. 30. — P. 68–73.
641. *Ordovas, J. M.* Gene-environment interactions: defining the playfield / Ordovas J. M., Corella D. // *Nutritional genomics. Discovering the Path to Personalized Nutrition* / eds. J. Kaput, R. L. Rodriguez. — N. Y.: Wiley-Interscience [et al.], 2006. — P. 57–84.
642. *Osborne, G.* Fuqua Selective Estrogen Receptor Modulators: Structure, Function, and Clinical Use / Osborne G., Hong (Holly) Zhao, Suzanne A. W. // *J. Clin. Oncol.* — 2000. — Vol. 18. — P. 3172–3186.

643. O'Shaughnessy, K. M. The genetics of essential hypertension / O'Shaughnessy K. M. // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2001. — Vol. 51, N 1. — P. 5–11.
644. Osteocalcin gene polymorphism is related to bone density in healthy adolescent females / Gustavsson A., Nordstrom P., Lorentzon R. [et al.] // Osteoporos Int. — 2000. — Vol. 11. — P. 847–851.
645. OXEGENE Collaborative Group. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 / Hadfield R. M., Manek S., Weeks D. E. [et al.] // Mol. Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 7, N 11. — P. 1073–1078.
646. Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation / Schaffer L., Scheid A., Spielmann P. [et al.] // Placenta. — 2003. — Vol. 24, N 10. — P. 941–950.
647. Pang, Z. J. Comparative study on the expression of cytokine-receptor genes in normal and preeclamptic human placentas using DNA microarrays / Pang Z. J., Xing F. Q. // J. Perinat. Med. — 2003. — Vol. 31, N 2. — P. 153–162.
648. Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips / Fotin A. V., Drobyshev A. L., Proudnikov D. Y. [et al.] // Nucleic Acids Res. — 1998. — Vol. 26, N 6. — P. 1515–1521.
649. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms / Menegon A., Board P. G., Blackburn A. C. [et al.] // Lancet. — 1998. — Vol. 352. — P. 1344–1346.
650. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia / Esplin M. S., Fausett M. B., Fraser A. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344, N 12. — P. 867–872.
651. Pegoraro R. J. Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI1) and platelet glycoprotein IIIa (PGIIIa) polymorphisms in Black South Africans with pre-eclampsia / Pegoraro R. J., Hira B., Rom L., Moodley J. // Acta Obstet. Gynecol. Scand. — 2003. — Vol. 82, N. 4. — P. 313–317.
652. Peltonen, L. Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era / Peltonen L., McKusick V. A. // Genomics and Medicine. — 2002. — Vol. 2. — P. 3–12.
653. Perkel J. M. So you want your own genome sequenced. What's that going to cost? / Perkel J. M. // The Scientist. — 2007. — Vol. 20, N 2. — P. 67.
654. Perls, T. What does it take to live to 100? / Perls T., Levenson R., Regan M., Puca A. // Mech. Ageing Dev. — 2002. — Vol. 123. — P. 231–242.
655. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism / Gilde A. J., van der Lee K. A., Willemsen P. H. [et al.] // Circ. Res. — 2003. — Vol. 92. — P. 518–524.
656. Peroxisome proliferator-activated receptor α gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes / Flavell D. M., Ireland H., Stephens J. W. [et al.] // Diabetes. — 2005. — Vol. 54. — P. 582–586.
657. Peschanski, M. Human embryonic stem cells, a dual therapeutic tool for monogenic diseases / Peschanski M. // Int. Congress of Myology, Mya 26–30. — Marseille, 2008. — P. 15.
658. PGC-1 α mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle / Norrbom J., Sundberg C. J., Ameln H. [et al.] // J. Appl. Physiol. — 2004. — Vol. 96. — P. 189–194.
659. PIA1 / A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis / Ridker P. M., Hennekens C. H., Schmitz C. [et al.] // Lancet. — 1997. — Vol. 349. — P. 385–388.
660. PIH Study Group. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension / Nalogowska-

- Glosnicka K., Lacka B. I., Zychma M. J. [et al.] // *Med. Sci. Monit.* — 2000. — Vol. 6, N 3. — P. 523–529.
661. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an *IL10* promoter polymorphism / Makris A., Xu B., Yu B. [et al.] // *Placenta.* — 2006. — Vol. 27, N 4–5. — P. 445–451.
662. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss / Kumar K., Govindaiah V., Naushad S. [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol.* — 2003. — Vol. 23. — P. 55–58.
663. *Pociot, F.* Genetics of type 1 diabetes mellitus / Pociot F., McDermott M. F. // *Genes and Immunity.* — 2002. — Vol. 3. — P. 235–249.
664. *Polifka, J. E.* Environmental toxins and recurrent pregnancy loss / Polifka J. E., Friedman J. M. // *Infert. Reprod. Med. Clin. North. Am.* — 1991. — Vol. 2. — P. 175–213.
665. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study / Ordovas J. M., Corella D., Cupples L. A. [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2002. — Vol. 75. — P. 38–46.
666. Polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism as modulators of acquired P53 mutations in bladder cancer / Brockmoller J., Kaiser R., Kerb R. [et al.] // *Pharmacogenetics.* — 1996. — Vol. 6. — P. 535–545.
667. Polymorphism at the glutathione S-transferase. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma / Fryer A. A., Bianco A., Hepple M. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. — Vol. 161. — P. 1437–1442.
668. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss / Lissak A., Sharon A., Fruchter O. [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1999. — Vol. 8. — P. 126–130.
669. Polymorphism for transforming growth factor beta 1–509 (TGF-B1–509): association with endometriosis / Hsieh Y. Y., Chang C. C., Tsai F. J. [et al.] // *Biochem. Genet.* — 2005. — Vol. 43, N 5–6. — P. 203–210.
670. Polymorphism in the tumor necrosis factor- α gene in women with preeclampsia / Heiskanen J., Romppanen E. L., Hiltunen M. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2002. — Vol. 19, N 5. — P. 220–223.
671. Polymorphism of INS VNTR is associated with glutamic acid decarboxylase antibodies and postprandial C-peptide in patients with onset of diabetes after 35 years of age / Matejkova-Behanova M., Vankova M., Hill M. [et al.] // *Physiol. Res.* — 2004. — Vol. 53. — P. 187–190.
672. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and blood pressure in a Japanese general population (the Shigaraki Study) / Tamaki S., Nakamura Y., Tsujita Y. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 2002. — Vol. 25, N 6. — P. 843–848.
673. Polymorphisms for interleukin-4 (IL-4)–590 promoter, *IL4* intron3, and tumor necrosis factor α –308 promoter: non-association with endometriosis / Hsieh Y. Y., Chang C. C., Tsai F. J. [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* — 2002. — Vol. 16, N 3. — P. 121–126.
674. Polymorphisms in biotransformation enzymes and the risk for recurrent early pregnancy loss / Zusterzeel P. L., Nelen W. L., Roelofs H. M. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 6, N 5. — P. 474–478.
675. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome / Hobbs C. A., Sherman S. L., Yi P. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67. — P. 623–630.

676. Polymorphisms in oestrogen and progesterone receptor genes: possible influence on prolactin levels in women / Westberg L., Ha H. P., Baghaei F. [et al.] // *Clin. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 61, N 2. — P. 216–223.
677. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages / Buchholz T., Lohse P., Rogenhofer N. [et al.] // *Human Reproduction.* — 2003. — Vol. 18, N 11. — P. 2473–2477.
678. Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene but not estrogen receptor alpha gene affect the risk of developing endometriosis in a Japanese population / Wang Z., Yoshida S., Negoro K. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2004. — Vol. 81, N 6. — P. 1650–1656.
679. Polymorphisms in the IL-4 and IL-4 receptor alpha chain genes and atopic bronchial asthma in North-West of Russia / Mogilina S. V., Ugleva E. M., Kelembet N. A. [et al.] // 37 European human genetics conference: abst. Book. — Prague, 2005. — P. 279.
680. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adult Russian patients / Gra O. A., Glotov A. S., Nikitin E. A. [et al.] // *American Journal of Hematology.* — 2008. — Vol. 83, N 4. — P. 279–287.
681. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor type 1 genes in essential hypertension in a Polish population / Dzida G., Sobstyl J., Puzniak A. [et al.] // *Med. Sci. Monit.* — 2001. — Vol. 7, N 6. — P. 1236–1241.
682. Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women / Masi L., Becherini L., Colli E. [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1998. — Vol. 248, N 1. — P. 190–195.
683. Polymorphisms of the gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a Caucasian population / Wong N. A., Rae F., Bathgate A. [et al.] // *Toxicol. Lett.* — 2000. — Vol. 115, N 1. — P. 17–22.
684. Polymorphisms of the insertion / deletion ACE and M235T *AGT* genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data / Mondry A., Loh M., Liu P. [et al.] // *BMC. Nephrol.* — 2005. — Vol. 11, N 6(1). — P. 1–10.
685. *Popov, V.* Absence of association between the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and borderline hypertension in men of St Petersburg, Russia / Popov V., Fomicheva E., Kovalev J., Schwartz E. // *J. Hum. Hypertens.* — 1996. — Vol. 10, N 8. — P. 557–559.
686. Positional genomic analysis identifies the beta(2)-adrenergic receptor gene as a susceptibility locus for human hypertension / Bray M. S., Krushkal J., Li L. [et al.] // *Circulation.* — 2000. — Vol. 101. — P. 2877–2882.
687. Possible gene dosage effect of glutathione S-transferases on atopic asthma. Using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers / Brasch-Andersen Ch., Christiansen L., Tan Q. [et al.] // *Hum. Mutat.* — 2004. — Vol. 24, N 3. — P. 208–214.
688. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis / Baranova H., Canis M., Ivaschenko T. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 5, N 7. — P. 636–641.
689. Possible susceptibility of the HLA-DPB1*0402 and HLA-DPB1*04 alleles to unexplained recurrent abortion: analysis by means of polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism method / Takakuwa K., Hataya I., Arakawa M. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 1999. — Vol. 42. — P. 233–239.
690. PPARA gene variation and physical performance in Russian athletes / Ahmetov I. I., Mozhayskaya I. A., Flavell D. M. [et al.] // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2006. — Vol. 97, N 1. — P. 103–108.

691. PPARGC1A genotype (Gly482Ser) predicts exceptional endurance capacity in European men / Lucia A., Gomez-Gallego F., Barroso I. [et al.] // *J. Appl. Physiol.* — 2005. — Vol. 99, N 1. — P. 344–348.
692. PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) promotes cardiac mitochondrial biogenesis / Lehman J. J., Barger P. M., Kovacs A. [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 106. — P. 847–856.
693. Prevalence of diverse antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion / Yamada H., Atsumi T., Kato E. H. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2003. — Vol. 80. — P. 1276–1278.
694. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss / Carp H., Salomon O., Seidman D. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17, N 6. — P. 1633–1637.
695. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol / Bulun S. E., Cheng Y. H., Yin P. [et al.] // *Mol. Cell Endocrinol.* — 2006. — Vol. 27. — P. 94–103.
696. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis / Wieser F., Schneeberger C., Tong D. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2002. — Vol. 77, N 2. — P. 309–312.
697. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy / Rosenwasser L. J., Klemm D. J., Dresback J. K. [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* — 1995. — Vol. 25, Suppl. 2. — P. 74–78.
698. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases / Baranov V. S., Ivaschenko T., Bakay B. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 97, N 4. — P. 516–520.
699. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy / Murphy R. P., Donoghue C. [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* — 2000. — Vol. 20, N 1. — P. 266.
700. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells / Pazmany L., Mandelboim O., Vales-Gomez M. [et al.] // *Science.* — 1996. — Vol. 274, N 5288. — P. 792–795.
701. Proteomics. From protein sequence to function / eds. Pennington S. R., Dunn M. J. — Trowbridge: The Cromwell Press, 2001. — 313 p.
702. Rapid genotyping of hypomorphic alleles of thiopurine S-methyltransferase for clinical applications using the DNA-microchip technique / Nasedkina T. V., Fedorova O. E., Glotov A. S. [et al.] // *Eur. Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 14, N 9. — P. 991–998.
703. Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis / Melioli G., Semino C., Semino A. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 1993. — Vol. 30, N 4. — P. 218–227.
704. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene / Grant S. F., Reid D. M., Blake G. [et al.] // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 14, N 2. — P. 203–205.
705. Rees, D. C. World distribution of factor V Leiden / Rees D. C., Cox M., Clegg J. B. // *Lancet.* — 1995. — Vol. 346, N 8983. — P. 1133–1134.
706. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment / Bulun S. E., Lin Z., Imir G. [et al.] // *Pharmacol. Rev.* — 2005. — Vol. 57, N3. — P. 359–83.
707. Reiss, J. Polymerase chain reaction and its potential role in clinical diagnostics and research / Reiss J. // *J. Intern. Med.* — 1991. — Vol. 230. — P. 391–395.
708. Relation of alleles of the collagen type I alpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women / Uitterlinden A. G., Burger H., Huang Q. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338, N 15. — P1016–1021.

709. Relation of the estrogen receptor alpha gene microsatellite polymorphism to bone mineral density and the susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Chinese women in Taiwan / Chen H. Y., Chen W. C., Tsai H. D. [et al.] // *Maturitas*. — 2001. — Vol. 40. — P. 143–150.
710. Renin-angiotensin gene polymorphism in children with uremia and essential hypertension / Papp F., Friedman A. L., Bereczki C. [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* — 2003. — Vol. 18, N 2. — P. 150–154.
711. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension / Giner V., Poch E., Bragulat E. [et al.] // *Hypertension*. — 2000. — Vol. 35, N 1, Pt. 2. — P. 512–517.
712. *Ridderstrale, M.* Increased risk of obesity associated with the variant allele of the PPARG-C1A Gly482Ser polymorphism in physically inactive elderly men / Ridderstrale M., Johansson L. E., Rastam L., Lindblad U. // *Diabetologia*. — 2006. — Vol. 49, N 3. — P. 496–500.
713. *Rier, S.* Environmental dioxins and endometriosis / Rier S., Foster W. G. // *Semin. Reprod. Med.* — 2003. — Vol. 21, N 2. — P. 145–154.
714. *Robinson, W. H.* Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis / Robinson W. H., Steinman L., Zamvil S. // *Nature Rev. Immunol.* — 2003. — Vol. 3. — P. 483–492.
715. *Roche, H. M.* The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics / Roche H. M., Phillips C., Gidney M. J. // *Proc. Nutr. Soc.* — 2005. — Vol. 64, N 3. — P. 371–377.
716. *Roche, P. A.* DNA testing, banking, genetic privacy / Roche P. A., Annas G. J. // *N. E. J. Med.* — 2006. — Vol. 355, N 6. — P. 546–554.
717. Role of cytokines in progression of endometriosis / Harada T., Enatsu A., Mitsunari M. [et al.] // *Gynecol. Obstet. Invest.* — 1999. — Vol. 47, N 1. — P. 34–40.
718. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial / Kaplitt M. G., Feigin A. [et al.] // *Lancet*. — 2007. — Vol. 369 (9579). — P. 2097–2105.
719. *Santoro, R.* Prothrombotic gene mutations in women with recurrent abortions and intrauterine fetal death / Santoro R., Iannaccaro P., Sottillotta G. // *Minerva Ginecol.* — 2005. — Vol. 57, N 4. — P. 447–450.
720. *Schweppe, K. W.* Endometriosis market research: an overview of findings in Europe and the United States / Schweppe K. W. // *Drugs Today*. — 2005. — Vol. 41, A. — P. 1–4.
721. Segregation analysis of the specific response to allergens: a recessive major gene controls the specific IgE response to Timothy grass pollen / Dizier M. H., James A., Faux J. [et al.] // *Genet. Epidemiol.* — 1999. — Vol. 18. — P. 128–142.
722. *Semple, R. K.* PPAR gamma and human metabolic disease / Semple R. K., Chatterjee V. K., O'Rahilly S. // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116, N 3. — P. 581–589.
723. *Seng, K. Ch.* The success of the genome-wide association approach: a brief story of long struggle / Seng K. Ch., Seng Ch. K. // *Europ. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 16. — P. 554–564.
724. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA / Greene P., Gilna M., Waterfield A. [et al.] // *Science*. — 1986. — Vol. 231. — P. 1150–1154.
725. Shuldiner Genetic variation in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain / Nicklas B. J., van Rossum E. F., Berman D. M. [et al.] // *Diabetes*. — 2001. — Vol. 50, N 9. — P. 2172–2176.
726. *Simoneau, J.-A.* Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle / Simoneau J.-A., Bouchard C. // *FASEB J.* — 1995. — Vol. 9. — P. 1091–1095.
727. *Singh, S.* Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? / Singh S., Evans T. W. // *Eur. Respir. J.* — 1997. — Vol. 10. — P. 699–707.

728. Skadhauge, L. R. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs / Skadhauge L. R., Christensen K., Kyvik K. O., Sigs-gaard T. // *Eur. Respir. J.* — 1999. — Vol. 13. — P. 8–14.
729. Skajaa, K. Pre-eclampsia. Etiology — physiopathology — treatment / Skajaa K. // *Ugeskr Laeger.* — 1993. — Vol. 155, N. 24. — P. 1845–1851.
730. Skeletal muscles Gene expression profiles in 20–29 year old and 65–71 year old woman / Welle S., Brooks A. I., Delhanty J. M. [et al.] // *Exp. Gerontol.* — 2004. — Vol. 39. — P. 369–377.
731. Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis / Southern E. M. // *J. Mol. Biol.* — 1975. — Vol. 98, N 3. — P. 503–517.
732. Stroth, U. The renin angiotensin system and its receptors / Stroth U., Unger T. // *J. Cardiovascular Pharmacol.* — 1999. — Vol. 33. — P. S21–28.
733. Stumvoll, M. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism / Stumvoll M., Haring H. // *Diabetes.* — 2002. — Vol. 51, N 8. — P. 2341–2347.
734. Sun, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis / Sun Y. // *Free Radic. Biol. Med.* — 1990. — Vol. 8, N 6. — P. 583–599.
735. Susceptibility to pre-eclampsia in Finnish women is associated with R485K polymorphism in the factor V gene, not with Leiden mutation / Faisel F., Romppanen E. L., Hiltunen M. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2004. — Vol. 12, N 3. — P. 187–191.
736. Takahashi, N. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension / Takahashi N., Smithies O. // *Trends. Genet.* — 2004. — Vol. 20, N 3. — P. 136–145.
737. Tests of linkage and/or association of *TGF- β 1* and *COL1A1* genes with bone mass / Long, Peng-Yuan Liu, Yan Lu [et al.] // *Osteoporos Int.* — 2005. — Vol. 16. — P. 86–92.
738. That Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Delta Influences Cholesterol Metabolism in Men / Skogsberg J., Kannisto K., Cassel T. N. [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* — 2003. — Vol. 23. — P. 637–643.
739. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor–1 gene is associated with severe preeclampsia / Yamada N., Arinami T., Yamakawa-Kobayashi K. [et al.] // *J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 45, N 3. — P. 138–141.
740. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes / Nazarov I. B., Woods D. R., Montgomery H. E. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 9. — P. 797–801.
741. The Arg353Gln Polymorphism Reduces the Level of Coagulation Factor VII / Hu-nault M., Arbin A. A., Lopaciuk S. [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* — 1997. — Vol. 17. — P. 2825–2829.
742. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor / Hershey G. K., Friedrich M. F., Esswein L. A. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 337. — P. 1720–1725.
743. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms / Gong G., Stern H. S., Cheng S. C. [et al.] // *Osteoporos Int.* — 1999. — Vol. 9, N 1. — P. 55–64.
744. The associations of ACE polymorphisms with physical, physiological and skill parameters in adolescents / Moran C. N., Vassilopoulos C., Tsiokanos A. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 3. — P. 1–8.

745. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health / Kaput J., Ordovas J. M., Ferguson L. [et al.] // *Brit. J. Nutrition.* — 2005. — Vol. 94. — P. 623–632.
746. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1 / Gregory S. G., Barlow K. F., McLay K. E. [et al.] // *Nature.* — 2006. — Vol. 441. — P. 315–321.
747. The DNA sequence of the human X chromosome / Ross M. T. [et al.] // *Nature.* — 2005. — Vol. 434. — P. 325–337.
748. The effect of estradiol and a combined estradiol/progestagen preparation on insulin sensitivity in healthy postmenopausal women / Duncan A. C., Lyall H., Roberts R. N. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1999. — Vol. 84, N 7. — P. 2402–2407.
749. The G20210A prothrombin-gene mutation and the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 5G/5G genotype are associated with early onset of severe preeclampsia / Gerhard A., Goecke T. W., Beckmann M. W. [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — Vol. 3, N 4. — P. 686–691.
750. The Genetics of Asthma. ADAM33 as an Example of a Susceptibility Gene / Holgate, Yang, Haitchi [et al.] // *Proceedings of the american thoracic society.* — 2006. — Vol 3. — P. 440–442.
751. The human gene map for performance and health related fitness phenotype: the 2004 update / Wolfarth B., Bray M. S., Hagberg J. M. [et al.] // *Human Fitness Gene Map.* — 2004. — URL: <http://www.acsm-msse.org>. (дата доступа — 14. 01. 2009).
752. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update / Rankinen T., Bray M. S., Hagberg J. M. [et al.] // *Med. Sci. Sports. Exerc.* — 2006. — Vol. 38, N 11. — P. 1863–1888.
753. The impact of three-dimensional structure on the expression of P1A alloantigens on human integrin beta 3 / Honda S., Honda Y., Bauer B. [et al.] // *Blood.* — 1995. — Vol. 86. — P. 234–242.
754. The local effects of Cachectin /Tumor Necrosis Factor on Wound Healing / Salomon G. D., Kasid A., Cromack D. T. [et al.] // *Ann. Surg.* — 1991. — Vol. 214, N 2. — P. 175–180.
755. The methyltetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) as a risk factor for essential hypertension in Caucasians / Heux S., Morin F., Lea R. A. [et al.] // *Hypertens. Res.* — 2004. — Vol. 27, N 9. — P. 663–667.
756. The PAI-1 gene locus 4G /5G is associated with a family history of coronary artery disease / Margaglione M., Cappuci G., Colaizzo D. [et al.] // *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* — 1998. — Vol. 18. — P. 152–156.
757. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women / Gross C., Eccleshall T. R., Malloy P. J. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 1996. — Vol. 11, N 12. — P. 1850–1855.
758. The PROGINS progesterone receptor gene polymorphism and idiopathic recurrent miscarriage / Kurz C., Tempfer C. B., Boeskoer S. [et al.] // *Soc. Gynecol. Investig.* — 2001. — Vol. 8, N 5. — P. 295–298.
759. The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis / Chang C. C., Hsieh Y. Y., Tsai F. J. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2002. — Vol. 77, N 1. — P. 43–45.
760. The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity / Rosa-Rosa L., Zimmermann N., Bernstein J. A. [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 1999. — Vol. 104. — P. 1008–1014.

761. The role of angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein E polymorphisms on lipid composition in newborn infants with intrauterine growth restriction / Akisu M., Balim Z., Cetin H. [et al.] // *Early Hum. Dev.* — 2004. — Vol. 78, N 2. — P. 95–103.
762. The Sp1 binding site polymorphism in the collagen type I alpha 1 (COL1A1) gene is not associated with bone mineral density in healthy children, adolescents, and young adults / Berg J. P., Lehmann E. H., Stakkestad J. A. [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* — 2000. — Vol. 2. — P. 261–265.
763. The structure of haplotype blocks in the human genome / Gabriel S. B., Schaffner S. F., Nguyen H. [et al.] // *Science*. — 2002. — Vol. 296, N 5576. — P. 2225–2229.
764. The transcriptional profile of aging in the human kidney / Graham E., Rodwell J., Sonu R. [et al.] // *PLOS Biology*. — 2004. — Vol. 2, N 12. — P. 1–23.
765. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells / Dawson S. J., Wiman B., Hamsten A. [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268, N 15. — P. 10739–10745.
766. The Wellcome Trust Case Control Consortium Genome wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3 000 shared controls // *Nature*. — 2007. — Vol. 447. — P. 661–678.
767. Three allele combinations associated with multiple sclerosis / Favorova O., Favorov A. V., Boiko A. N. [et al.] // *BMC Med. Genetics*. — 2006. — Vol. 7. — P. 63–75.
768. Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study / Mello G., Parretti E., Marozio L. [et al.] // *Hypertension*. — 2005. — Vol. 46, N 6. — P. 1270–1274.
769. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester / Pihusch R., Buchholz T., Lohse P. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2001. — Vol. 46, N 2. — P. 124–131.
770. Tillib, S. V. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology / Tillib S. V., Mirzabekov A. D. // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2001. — Vol. 12, N 1. — P. 53–58.
771. *TNF* gene polymorphisms: association with multiple sclerosis susceptibility and severity / Gusev E., Sudomoina M., Boiko A. [et al.] // *Frontiers in multiple sclerosis* / ed. Martin Dunitz. — London, 1997. — P. 35–41.
772. *TNF* polymorphisms in Alzheimer Disease and functional implications on CSF beta-amyloid level / Laws S. M., Pernecky R., Wagenpfeil S. [et al.] // *Hum. Mutat.* — 2005. — Vol. 26, N 1. — P. 29–35.
773. *TNF*-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients / Huizinga T. W., Westendorp R. G., Bollen E. L. [et al.] // *J. Neuroimmunol.* — 1997. — Vol. 72. — P. 149–153.
774. Tomolin, N. V. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats / Tomolin N. V. // *BioEssa*. — 2008. — Vol. 30. — P. 338–348.
775. Torry, D. S. Determinants of placental vascularity / Torry D. S., Hinrichs M., Torry R. J. // *Am. J. Reprod Immunol.* — 2004. — Vol. 51, N 4. — P. 257–268.
776. Toward a major risk factor for atopic eczema: a meta-analysis of filaggrin polymorphism data / Baurecht H., Irvine A. D., Novak N. [et al.] // *J. Allerg. Clin. Immunol.* — 2007. — Vol. 120. — P. 1406–1412.
777. Tumour necrosis factor alpha and bipolar affective puerperal psychosis / Middle F., Jones I., Robertson E. [et al.] // *Psychiatr. Genet.* — 2000. — Vol. 10, N 4. — P. 195–198.

778. Two distinct *MICA* gene markers discriminate major autoimmune diabetes types / Gambelunghe G., Ghaderi M., Tortoioli C. [et al.] // *J. Endocrinology and Metabolism*. — 2001. — Vol. 86, N 8. — P. 3754–3760.
779. Two exonic single nucleotide polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene are jointly associated with preeclampsia / Laasanen J., Romppanen E. L., Hiltunen M. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 10, N 9. — P. 569–573.
780. Two new single-nucleotide polymorphisms in the *COLIA1* upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density / Garcia-Giralt N., Nogues X., Enjuanes A. [et al.] // *J. Bone and Mineral Research*. — 2002. — Vol. 17. — P. 384–393.
781. Two RFLPs at the human renin (ren) gene locus / Frossard P. M., Gonzalez P. A., Fritz L. C. [et al.] // *Nucleic. Acids. Res.* — 1986. — Vol. 27. — P. 4380.
782. *Tyko, B.* Imprinted genes in placental growth and obstetric disorders / Tyko B. // *Cytogenet. Genome Res.* — 2006. — Vol. 113. — P. 271–278
783. *Undlien, D.* HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? / Undlien D., Lie B., Thorsby E. // *Trends in Genetics*. — 2001. — Vol. 17, N 2.
784. Validity and Utility of a LRRK2 G2019S mutation test for the diagnosis of Parkinson's disease / Kay D. M., Bird T. D., Zabetlan C. P. [et al.] // *Genet. Test*. — 2006. — Vol. 10, N 3. — P. 221–227.
785. *Van Lieshout, E.* Localization of glutathione S-transferase α and π in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age / Van Lieshout E., Knapen M., Lange W. // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13. — P. 1380–1386.
786. *Van Ommen, G. J. B.* The Human Genome Project and the future of diagnostics, treatment and prevention / Van Ommen G. J. B., Bakker E. J. T., den Dunnen // *Lancet*. — 1999. — Vol. 354, Suppl. 1. — P. 5–10.
787. Variability and validity of polymorphism associated studies in Parkinson's disease / Tan E. K., Khajvi M., Thoronby J. L. [et al.] // *Neurology*. — 2000. — Vol. 55. — P. 533–538.
788. Variation in bradykinin receptor genes increases the cardiovascular risk associated with hypertension / Dhamrait S. S., Payne J. R., Li P. [et al.] // *Eur. Heart. J.* — 2003. — Vol. 24, N 18. — P. 1672–1680.
789. Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males / Fornage M., Amos C. I., Kardia S. [et al.] // *Circulation*. — 1998. — Vol. 97, N 18. — P. 1773–1779.
790. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss / Papazoglou D., Galazios G., Papatheodorou K. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2005. — Vol. 83, N 4. — P. 959–963.
791. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia / Papazoglou D., Galazios G., Koukourakis M. I. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2004. — Vol. 10, N 5. — P. 321–324.
792. Vitamin D receptor alleles are associated with the rate of bone turnover only in women with low bone mineral density / Weel A. E., Colin E. M. [et al.] // *Bone*. — 1998. — Vol. 23, N 5, Suppl. — P. S372.
793. Vitamin D receptor alleles. bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women / Tokita A., Matsumoto H., Morrison N. A. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 1996. — Vol. 11, N 7. — P. 1003–1009.

794. Vitamin D Receptor FokI Polymorphisms Affect Calcium Absorption, Kinetics, and Bone Mineralization Rates During Puberty / Abrams S., Griffin I., Hawthorne K. [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2005. — Vol. 20, N 6. — P. 945–953.
795. Vitamin D receptor genotype is not associated with bone mineral density in three ethnic / regional groups / Spotila L. D., Caminis J., Johnston R. [et al.] // *Calcif Tissue Int.* — 1996. — Vol. 59. — P. 235–237.
796. Volkova, M. V. Comparative analysis of apo(a) gene alleles: distribution of pentanucleotide repeats in position –1373 and C/T transition in position +93 among patients with myocardial infarction and a control group in St. Petersburg, Russia / Volkova M. V., Vasina V. I., Fomicheva E. V., Schwartz E. I. // *Biochem. Mol. Med.* — 1997. — Vol. 61, N 2. — P. 208–213.
797. Wadman, M. Genome miners rush to stake claims / Wadman M. // *Nature.* — 2007. — Vol. 447.
798. Wagschal, A. Genomic imprinting in placenta / Wagschal A., Fell R. // *Genome Res.* — 2006. — Vol. 113. — P. 90–98.
799. Walley, A. J. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy / Walley A. J., Cookson W. O. // *J. Med. Genet.* — 1996. — Vol. 33. — P. 689–692.
800. Wang, Z. SNP's, protein structure and disease / Wang Z., Moulton J. // *Hum. Mutat.* — 2001. — Vol. 17. — P. 263–270.
801. Wellcome Trust Case Control Consortium Genome –wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3 000 shared controls / *Nature.* — 2007. — Vol. 447, N 7. — P. 661–678
802. Wen, S. Y. Rapid detection of the known SNPs of CYP2C9 using oligonucleotide microarray / Wen S. Y., Wang H., Sun O. J., Wang S. Q. // *World. J. Gastroenterol.* — 2003. — Vol. 9, N 6. — P. 1342–1346.
803. Wikipedia, the free encyclopedia. Alzheimer disease URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Alzheimer's_disease. (дата доступа — 14. 01. 2009).
804. Williams, R. P. Biochemical individuality: The basis for Genotrophic concept / Williams R. P. — New York, 2005. — 327 p.
805. Wilton, A. N. Pre-eclampsia and HLA-DR4 / Wilton A. N., Cooper D. W. // *Lancet.* — 1990. — Vol. 336, N. 8710. — P. 323.
806. Wiwanitkit, V. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and pre-eclampsia: an appraisal / Wiwanitkit V. // *Arch. Gynecol. Obstet.* — 2006. — Vol. 273, N 6. — P. 322–324.
807. Wood, R. J. The genetics of osteoporosis: vitamin D receptor polymorphisms / Wood R. J., Fleet J. C. // *Annual Rev. Nutr.* — 1998. — Vol. 18. — P. 233–258.
808. Woods, D. R. The ACE I/D polymorphism and human physical performance / Woods D. R., Humphries S. E., Montgomery H. E. // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2000. — Vol. 11, N 10. — P. 416–420.
809. Wramsby, M. L. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation / Wramsby M. L., Sten-Linder M., Bremme K. // *Fertil. Steril.* — 2000. — Vol. 74, N 5. — P. 987–991.
810. WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometrial stromal cells / Gurates B., Sebastian S., Yang S. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Vol. 87, N 9. — P. 4369–4377.
811. Xenobiotic metabolism genes and the risk of recurrent spontaneous abortions / Hirvonen A., Taylor J. A., Wilcox A. [et al.] // *Epidemiology.* — 1996. — Vol. 7. — P. 206–208.

812. *Yager, J. D.* Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis / Yager J. D., Liehr J. G. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1996. — Vol. 36. — P. 203–232.
813. *Yang, N.* ACTN3 genotype is associated with human elite performance / Yang N., Daniel G. M., Jason P. G. // *American J. Human Genetics.* — 2003. — Vol. 73. — P. 627–631.
814. *Yu, H.* Relationship between polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and the response to angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertensive patients / Yu H., Zhang Y., Liu G. // *Hypertens. Res.* — 2003. — Vol. 26, N 11. — P. 881–886.
815. *Zeitoun, K. M.* Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target / Zeitoun K. M., Bulun S. E. // *Fertil. Steril.* — 1999. — Vol. 72, N 6. — P. 961–969.
816. *Zetterberg, H.* Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications / Zetterberg H. // *Reprod. Biol. and Endocr.* — 2004. — Vol. 2. — P. 7.
817. *Zimmern, R. L.* The evaluation of genetic tests / Zimmern R. L., Krose M. // *J. Publ. Health.* — 2007. — Vol. 1. — P. 1–5.
818. *Zimmern, R. L.* The clinical use of genetics and molecular biomarkers: a public health perspectives / Zimmern R. L. // *Europ. J. Human Genetics.* — 2008. — Vol. 16, Suppl. 2. — P. 7.
819. *Zintzaras E.* Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis / Zintzaras E., Hadjigeorgiou G. M. // *J. Hum. Genet.* — 2004. — Vol. 49. — P. 123–125.
820. *Zondervan, K. T.* The genetic basis of endometriosis / Zondervan K. T., Cardon L. R., Kennedy S. H. // *Curr Opin Obstet Gynecol.* — 2001. — Vol. 13, N 3. — P. 309–314.
821. *Zuspan, F. P.* Preventing preeclampsia / Zuspan F. P., Samuels P. // *N. Engl. J. Med.* — 1993. — Vol. 329, N 17. — P. 1265–1266.

Научное издание

Под редакцией

Баранова Владислава Сергеевича

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ —
ОСНОВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ
И ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

ООО «Издательство Н-Л»

Генеральный директор В. Г. Родин

Выпускающий редактор Л. А. Титова

Корректоры Е. Н. Думова, О. Е. Ларионова

Верстка В. Н. Фролов

Изд. лиц. ИД № 06413 от 10.12.2001.

Подписано в печать 06.10.2009.

Формат 60×90/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Times New Roman.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 33. Тираж 2000 экз.

Номер заказа:

Оригинал-макет изготовлен ООО «Издательство Н-Л».

Отпечатано по технологии СtP

в ОАО «Печатный двор» им. А. М. Горького

197110, Санкт-Петербург, Чкаловский пр., 15.

По вопросам приобретения издания обращаться
в ООО «Издательство Н-Л»

198152, Санкт-Петербург, ул. Автовская, д. 17, оф. 5а

Тел./факс: (812) 784-97-51; 784-97-50

E-mail: nl@n-l.ru

ISBN 978-5-94869-084-1

